



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS
DA USC (CIEDUS)

TESIS DE DOCTORADO

**ESTUDIO FARMACOLÓGICO DE DERIVADOS DE
CUMARINA CON POTENCIAL APLICACIÓN EN EL
TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES
NEURODEGENERATIVAS**

Fernanda Rodríguez Enríquez

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL EN CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE MEDICAMENTOS

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2019





DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

ESTUDIO FARMACOLÓGICO DE DERIVADOS DE CUMARINA CON POTENCIAL APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Dña. Fernanda Rodríguez Enríquez

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) *Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Compostela, 10 de octubre de 2019

Fdo. Fernanda Rodríguez Enríquez



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

ESTUDIO FARMACOLÓGICO DE DERIVADOS DE CUMARINA CON POTENCIAL APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Dña. María Dolores Viña Castelao
D. José Ángel Fontenla Gil
Dña. María de los Reyes Laguna Francia

INFORMA/N:

Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. Fernanda Rodríguez Enríquez, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, 10 de octubre de 2019.

Fdo. Dña. María Dolores Viña Castelao

Fdo. D. José Ángel Fontenla Gil

Fdo. Dña. María de los Reyes Laguna Francia





A mi madre



AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización de esta investigación.

De manera especial quiero agradecer a mi tutora y directora de tesis, la Dra. Dolores Viña Castela, por haber sido la primera persona en abrirme las puertas al mundo de la investigación y haber recorrido conmigo el camino hasta este momento. Sin su orientación, apoyo y confianza esto no habría sido posible. Gracias de corazón.

Quisiera también agradecer a mis directores de tesis, el Dr. José Ángel Fontenla Gil y la Dra. Reyes Laguna Francia, por su ayuda, la paciencia que han demostrado, su supervisión y las sugerencias aportadas.

A los doctores Maria João Matos, Elías Quezada, Carmen Costas y Carmen Terán, por haber compartido conmigo sus cumarinas. Sin vuestro trabajo esta tesis no tendría razón de ser. Agradezco también este trabajo a todas aquellas personas que, de una forma u otra, hicieron mi estancia en el laboratorio más agradable. A Ana, por haber estado siempre dispuesta a ayudar, a Manolo y Thiago, por todas sus enseñanzas y su entusiasmo, y a Maribel por dejarme formar parte de su equipo y aprender nuevas técnicas experimentales.

A mis compañeros del laboratorio, especialmente a Ana, Chiara, Lucía, Carla, Diego y Javi, pues vosotros habéis logrado que el trabajo se haya convertido en amistad. Gracias por las risas, los momentos de crisis salvados con una conversación, las sorpresas de comidas de tupper y vuestro apoyo.

A los de Santiago ahora y siempre. A Cebey, Evis, Juanchi, Fatimón, Cuerva, Mila, Noe, Alba, Diogo y el pequeñito Dante, porque con vosotros cualquier momento se transforma en una fiesta. Desde los martes fatídicos a los extraños martes de karaoke, pasando por cada uno de los momentos que vivimos juntos (festivales, noches de juegos, cumpleaños brindando con probetas...). Geniales es decir poco.

A mis amigas María, Melina, Alba y Raquel, porque vosotras sois una constante en mi vida. No importa el tiempo o la distancia, cuando estamos juntas es como si no hubiera pasado el tiempo.

A David, por ser calma cuando yo era nervio y ser nervio cuando yo era calma. Has sabido entenderme, apoyarme y ayudarme en todo momento.

A todos mis amigos y a mi familia, especialmente a mi madre, por su apoyo incondicional, las fuerzas compartidas y su clásica frase «*lo importante es no dejar de hacerse preguntas*». Gracias a su ánimo, su sinceridad y su cariño me he convertido en la persona que soy. Gracias, mamá.

A todos, gracias.



DECLARACIÓN SOBRE CONFLICTO DE INTERESES

Dña. Fernanda Rodríguez Enríquez declara que, de acuerdo con las directrices de la Escuela de Doctorado Internacional en Ciencias de la Salud de la Universidade de Santiago de Compostela (acuerdo de 3 de mayo de 2018), no ha tenido ni tiene ningún posible conflicto de intereses en relación con la presente tesis doctoral.

En Santiago de Compostela, 10 de octubre de 2019.

Fdo. Fernanda Rodríguez Enríquez





ÍNDICE

1. RESUMEN DE LA TESIS DOCTORAL	27
1.1. RESUMEN EN CASTELLANO	29
1.2. ABSTRACT IN ENGLISH	30
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	33
2.1. INTRODUCCIÓN	35
2.2. ENFERMEDAD DE PARKINSON	40
2.2.1. Dopamina y receptores dopaminérgicos	48
2.2.2. Tratamiento farmacológico de la EP	51
2.3. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	59
2.3.1. Acetilcolina y receptores colinérgicos	69
2.3.2. Tratamiento farmacológico de la EA	71
2.4. CUMARINAS	75
2.4.1. Origen	75
2.4.2. Actividad farmacológica	76
2.4.2.1. Actividad antioxidante	77
2.4.2.2. Actividad antiinflamatoria	80
2.4.2.3. Inhibición enzimática	83
2.4.2.4. Actividad cardiovascular	94
2.4.2.5. Actividad antiadipogénica	95
2.4.2.6. Actividad en el SNC	96
2.5. RESVERATROL	99
2.5.1. Origen	99
2.5.2. Actividad farmacológica	100
2.5.2.1. Actividad antioxidante	101
2.5.2.2. Actividad antiinflamatoria	102
2.5.2.3. Actividad potenciadora de sirtuinas	103
2.5.2.4. Actividad sobre la MAO	103
2.6. CURCUMINA	105
2.6.1. Origen	105
2.6.2. Actividad farmacológica	107
2.6.2.1. Actividad antioxidante	108
2.6.2.2. Actividad antiinflamatoria	110

2.6.2.3. <i>Inhibición enzimática</i>	111
2.6.2.4. <i>Curcumina en la EP</i>	112
2.6.2.5. <i>Curcumina en la EA</i>	112
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	115
4. MATERIAL Y MÉTODOS	121
4.1. NUEVOS DERIVADOS DE CUMARINA OBJETO DE ESTUDIO	123
4.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA MAO	131
4.2.1. Fármacos, reactivos y otros compuestos químicos	131
4.2.2. Preparación de las disoluciones de compuestos y fármacos y preparación de los tampones	131
4.2.3. Determinación de la inhibición de las isoformas de la MAO	132
4.2.4. Reversibilidad	134
4.2.5. Expresión de resultados	135
4.3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LAS COLINESTERASAS	136
4.3.1. Fármacos, reactivos y otros compuestos químicos	136
4.3.2. Preparación de las disoluciones de los compuestos y fármacos y preparación de los tampones	136
4.3.3. Determinación de la inhibición de las colinesterasas	136
4.3.4. Expresión de los resultados	138
4.4. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE BACE1	140
4.4.1. Fármacos, reactivos y otros compuestos químicos	140
4.4.2. Preparación de las disoluciones de los compuestos y fármacos	140
4.4.3. Determinación de la inhibición de la BACE1	140
4.4.4. Expresión de los resultados	142
4.5. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE COX	144
4.5.1. Fármacos, reactivos y otros compuestos químicos	144
4.5.2. Preparación de las disoluciones de los compuestos y fármacos y preparación de los tampones	144
4.5.3. Aislamiento de la enzima COX-1	145
4.5.4. Determinación de la inhibición de la COX	146
4.5.5. Expresión de los resultados	147
4.6. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD SECUESTRADORA DE RADICALES LIBRES (DPPH[•])	149
4.6.1. Fármacos, reactivos y otros compuestos químicos	149
4.6.2. Preparación de las diluciones de los compuestos y fármacos	149
4.6.3. Determinación de la actividad secuestradora de radicales libres	149
4.6.4. Expresión de los resultados y representación gráfica	150
4.7. CULTIVOS CELULARES	152
4.7.1. Cultivo primario de neuronas de corteza motora	152

4.7.2. Cultivo de células SH-SY5Y	153
4.7.3. Determinación de la viabilidad celular	154
4.7.4. Expresión de los resultados, representación gráfica y análisis estadístico	156
4.8. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ERO.....	157
4.8.1. Fármacos, reactivos y otros compuestos químico.....	157
4.8.2. Preparación de las diluciones de los compuestos y fármacos	157
4.8.3. Medición de ERO intracelular	157
4.8.4. Expresión de los resultados, representación gráfica y análisis estadístico	158
4.9. AMPLIFICACIÓN POR RETROTRANSCRIPCIÓN-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	159
4.9.1. Fármacos, reactivos, otros compuestos químicos e iniciadores	159
4.9.2. Preparación de los reactivos de PCR	160
4.9.3. Extracción de ARN, transformación a ADNc y RT-qPCR	160
4.9.4. Expresión de los resultados, representación gráfica y análisis estadístico	163
4.10. CÁLCULO TEÓRICO DE PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y PASO A TRAVÉS DE BHE.....	164
4.11. ESTUDIO <i>IN VITRO</i> DE LA CAPACIDAD DE PASO A TRAVÉS DE BHE	164
4.11.1. Fármacos, reactivos y compuestos químicos	166
4.11.2. Determinación de paso a través de BHE	166
4.11.3. Expresión de los resultados	167
4.12. ESTUDIO <i>IN VIVO</i>	168
4.12.1. Animales.....	168
4.12.2. Estudios de comportamiento	169
4.12.2.1. <i>Fármacos, reactivos y otros compuestos químicos</i>	169
4.12.2.2. <i>Preparación de compuestos y fármacos</i>	169
4.12.2.3. <i>Equipos y dispositivos de medida</i>	170
4.12.2.4. <i>Test de campo abierto (OFT)</i>	172
4.12.2.5. <i>Test de reconocimiento de objeto (ORT)</i>	173
4.12.2.6. <i>Expresión de los resultados, análisis estadístico y representación gráfica</i>	175
4.12.3. Estudio de biodisponibilidad	176
4.12.3.1. <i>Preparación de las diluciones de compuestos y fármacos</i>	176
4.12.3.2. <i>Administración, tratamiento y toma de muestras</i>	176
4.12.3.3. <i>Preparación de las muestras de plasma</i>	177
4.12.3.4. <i>Identificación de los patrones</i>	177
4.12.3.5. <i>Identificación y cuantificación de las muestras biológicas</i>	179
4.12.3.6. <i>Presentación de los datos</i>	179
5. RESULTADOS.....	181
5.1. ACTIVIDAD INHIBIDORA SOBRE LAS ISOFORMAS DE LA ENZIMA MAO (IMAO) DE LOS DERIVADOS DE CUMARINA.....	183

5.1.1. Actividad inhibidora sobre las isoformas de la enzima MAO de los derivados de 3-fenilcumarina	184
5.1.2. Actividad inhibidora sobre las isoformas de la enzima MAO de los derivados de 3-(tiofen-2-il)cumarina	186
5.1.3. Actividad inhibidora sobre las isoformas de la enzima MAO de los derivados de 3-(6-oxo-1,6-dihidropiridazin-3-il)cumarina	187
5.1.4. Actividad inhibidora sobre las isoformas de la enzima MAO de los derivados de 3-(piridazin-3-il)cumarina	188
5.1.5. Actividad inhibidora sobre las isoformas de la enzima MAO de los derivados de 3-benzamidocumarina	191
5.1.6. Actividad inhibidora sobre las isoformas de la enzima MAO de los derivados de 3-ciclohexilamidocumarina y 3-heteroarilamidocumarina	193
5.1.7. Actividad inhibidora sobre las isoformas de la enzima MAO de los derivados de 7-benzamido-4-metilcumarina	194
5.1.8. Actividad inhibidora sobre las isoformas de la enzima MAO de los derivados de 7-alquilamido-4-metilcumarina y 7-heteroarilamido-4-metilcumarina	195
5.1.9. Actividad inhibidora sobre las isoformas de la enzima MAO de 4,4'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)bis(7,8-dihidroxicumarina) (A1A).....	196
5.1.10. Actividad inhibidora sobre las isoformas de la enzima MAO de los derivados de 3-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina	196
5.1.11. Actividad inhibidora sobre las isoformas de la enzima MAO de los derivados de 4-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina	197
5.1.12. Reversibilidad de la inhibición de la MAO-B	198
5.2. ACTIVIDAD INHIBIDORA SOBRE LAS ENZIMAS AChE Y BuChE DE LOS DERIVADOS DE CUMARINA	200
5.2.1. Actividad inhibidora sobre las enzimas AChE y BuChE de los derivados de 3-fenilcumarina.....	200
5.2.2. Actividad inhibidora sobre las enzimas AChE y BuChE de los derivados de 3-(tiofen-2-il)cumarina	201
5.2.3. Actividad inhibidora sobre las enzimas AChE y BuChE de los derivados de 3-(6-oxo-1,6-dihidropiridazin-3-il)cumarina	202
5.2.4. Actividad inhibidora sobre las enzimas AChE y BuChE de los derivados de 3-(piridazin-3-il)cumarina.....	202
5.2.5. Actividad inhibidora sobre las enzimas AChE y BuChE de los derivados de 3-benzamidocumarina	203
5.2.6. Actividad inhibidora sobre las enzimas AChE y BuChE de los derivados de 3 ciclohexilamidocumarina y 3-heteroarilamidocumarina	205
5.2.7. Actividad inhibidora sobre las enzimas AChE y BuChE de los derivados de 7-benzamido-4-metilcumarina	205
5.2.8. Actividad inhibidora sobre las enzimas AChE y BuChE de los derivados de 7-heteroarilamido-4-metilcumarina y 7-alquilamido-4-metilcumarina	206
5.2.9. Actividad inhibidora sobre las enzimas AChE y BuChE de 3,3'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina y de los derivados de 4,4'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina	207
5.2.10. Actividad inhibidora sobre las enzimas AChE y BuChE de los derivados de 3-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina	207
5.2.11. Actividad inhibidora sobre las enzimas AChE y BuChE de los derivados de 4-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina.....	208

5.3. ACTIVIDAD INHIBIDORA SOBRE LA ENZIMA BACE1 DE DERIVADOS DE CUMARINA ...	209
5.4. ACTIVIDAD INHIBIDORA SOBRE LA ENZIMA COX-1 DE DERIVADOS DE CUMARINA ...	211
5.4.1. Actividad inhibidora sobre la enzima COX de los derivados de 3-fenilcumarina	211
5.4.2. Actividad inhibidora sobre la enzima COX-1 de los derivados de 4,4'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina	213
5.4.3. Actividad inhibidora sobre la enzima COX-1 de los derivados 3-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina y 4-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina	213
5.5. CAPACIDAD DE NEUTRALIZACIÓN DE RADICALES LIBRES DE LOS DERIVADOS DE CUMARINA	216
5.5.1. Capacidad de neutralización de radicales libres de los derivados de 3-fenilcumarina.....	216
5.5.2. Capacidad de neutralización de radicales libres de los derivados de 3-(tiofen-2-il)cumarina	217
5.5.3. Capacidad de neutralización de radicales libres de los derivados de 3-(6-oxo-1,6-dihidropiridazin-3-il)cumarina y 3-(piridazin-3-il)cumarina	218
5.5.4. Capacidad de neutralización de radicales libres de los derivados de 3-benzamido-4-hidroxycumarina, 3-ciclohexilamido-4-hidroxycumarina y 3-heteroarilamido-4-hidroxycumarina.....	218
5.5.5. Capacidad de neutralización de radicales libres de los derivados de 7-benzamido-4-metilcumarina, 7-alkilamido-4-metilcumarina y 7-heteroarilamido-4-metilcumarina	219
5.5.6. Capacidad de neutralización de radicales libres de los derivados de 3,3'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina y 4,4'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina	219
5.5.7. Capacidad de neutralización de radicales libres de los derivados de 3-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina	220
5.5.8. Capacidad de neutralización de radicales libres de los derivados de 4-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina.....	220
5.6. ACTIVIDAD NEUROTÓXICA Y NEUROPROTECTORA DE LOS DERIVADOS DE CUMARINA	222
5.6.1. Actividad neurotóxica y neuroprotectora de los derivados 3-fenilcumarina	222
5.6.2. Actividad neurotóxica y neuroprotectora de los derivados de 3-(tiofen-2-il)cumarina.....	225
5.6.3. Actividad neurotóxica y neuroprotectora de los derivados de 3-(piridazin-3-il)cumarina	227
5.6.4. Actividad neurotóxica y neuroprotectora de los derivados de 3-ciclohexilamido-4-hidroxycumarina, 3-benzamido-4-hidroxycumarina y 3-heteroarilamidocumarina.....	229
5.6.5. Actividad neurotóxica y neuroprotectora de los derivados de 7-benzamido-4-metilcumarina, 7-alkilamido-4-metilcumarina y 7-heteroarilamido-4-metilcumarina	231
5.6.6. Actividad neurotóxica y neuroprotectora de 3,3'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina (H1i2) y de los derivados de 3-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina	233
5.6.7. Actividad neurotóxica y neuroprotectora de los derivados de 4,4'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina y 4-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina	235
5.6.8. Actividad neurotóxica y neuroprotectora de nanopartículas biodegradables de los derivados de 3-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina	235

5.7. REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO).....	238
5.8. EXPRESIÓN DE NFκB, NRF2, CASP3 Y TNFα	240
5.9. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS DERIVADOS DE CUMARINA Y PREDICCIÓN TEÓRICA DE PASO A TRAVÉS DE BHE.....	242
5.9.1. Propiedades fisicoquímicas y predicción de paso a través de BHE para los derivados de 3-fenilcumarina.....	242
5.9.2. Propiedades fisicoquímicas y predicción de paso a través de BHE para los derivados de 3-(tiofen-2-il)cumarina.....	243
5.9.3. Propiedades fisicoquímicas y predicción de paso a través de BHE para los derivados de 3-(6-oxo-1,6-dihidropiridazin-3-il)cumarina	244
5.9.4. Propiedades fisicoquímicas y predicción de paso a través de BHE para los derivados de 3-(piridazin-3-il)cumarina	245
5.9.5. Propiedades fisicoquímicas y predicción de paso a través de BHE para los derivados 3-benzamidocumarina.....	247
5.9.6. Propiedades fisicoquímicas y predicción de paso a través de BHE de los derivados 3-ciclohexilamidocumarina y 3-heteroarilamidocumarina	248
5.9.7. Propiedades fisicoquímicas y predicción de paso a través de BHE de los derivados 7-benzamido-4-metilcumarina.....	248
5.9.8. Propiedades fisicoquímicas y predicción de paso a través de BHE de los derivados de 7-alquilamido-4-metilcumarina y de 7-heteroarilamido-4-metilcumarina	249
5.9.9. Propiedades fisicoquímicas y predicción de paso a través de BHE de 3,3'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)bis(7,8-dihidroxycumarina) y de los derivados de 4,4'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina.....	250
5.9.10. Propiedades fisicoquímicas y predicción de paso a través de BHE de los derivados de 3-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina y 4-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina	250
5.10. CAPACIDAD <i>IN VITRO</i> DE ATRAVESAR LA BHE.....	252
5.11. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>: TEST DE CAMPO ABIERTO	254
5.11.1. Test de campo abierto en ratones no reserpinizados	254
5.11.2. Test de campo abierto en ratones reserpinizados	258
5.12. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>: TEST DE RECONOCIMIENTO DE OBJETO.....	263
5.12.1. Tiempo de latencia en ratones sin tratamiento previo con escopolamina.....	264
5.12.2. Tiempo de latencia en ratones tratados previamente con escopolamina	265
5.12.3. Frecuencia en ratones sin tratamiento previo con escopolamina	266
5.12.4. Frecuencia en ratones tratados previamente con escopolamina.....	268
5.12.5. Tiempo en zona en ratones sin tratamiento previo con escopolamina	270
5.12.6. Tiempo en zona en ratones tratados previamente con escopolamina.....	271
5.13. ESTUDIO <i>IN VIVO</i>: BIODISPONIBILIDAD.....	274
5.13.1. Identificación de los patrones.....	274
5.13.2. Cromatogramas	275
6. DISCUSIÓN	281
6.1. DERIVADOS DE CUMARINA CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE MAO	284

6.2. DERIVADOS DE CUMARINA CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE CHE	288
6.3. DERIVADOS DE CUMARINA CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE BACE1	290
6.4. DERIVADOS DE CUMARINA CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE COX	291
6.5. DERIVADOS DE CUMARINA CON ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA	294
6.6. CUMARINAS CON ACTIVIDAD MULTIDIANA	299
6.7. NEUROTOXICIDAD, PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y PREDICCIÓN DE PASO A TRAVÉS DE BHE	300
6.8. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>: OFT Y ORT	303
6.9. BIODISPONIBILIDAD	306
 7. CONCLUSIONES	 309
 8. BIBLIOGRAFÍA	 315
 9. ANEXOS	 339





LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

°C	Grados centígrados
λ	Longitud de onda
AA	Ácido araquidónico
AAALAC	<i>Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care</i>
AAPH	Cloruro de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)
Aβ	Placas β -amiloide
ABC	Área bajo la curva
AC	Adenililciclase
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
ADME	Absorción, distribución, metabolismo y eliminación
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADAS-cog	Escala de evaluación cognitiva de la EA
AINE	Antiinflamatorios no esteroideos
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
ANOVA	Análisis de varianza
AP1	Factor de transcripción activador de la proteína 1
ApoE	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora de amiloide (<i>Amyloid protein precursor</i>)
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
B	Benserazida
BACE1	β -secretasa
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro (<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>)
BHE	Barrera hematoencefálica
BuChE	Butirilcolinesterasa
Casp3	Caspasa3
CAT	Colinoacetiltransferasa
CBD	Cannabidiol
cDCFDA	Sonda diacetato de 5(6)-carboxi-2,7-diclorofluoresceína
CE₅₀	Concentración eficaz 50

C/EBPα	Proteína α potenciadora de la unión a CAAAT (<i>CCAAT/enhancer-binding protein α</i>)
ChEs	Colinesterasas
CI₅₀	Concentración inhibitoria 50
cm²	Centímetros cuadrados
CMCNa	Carboximetilcelulosa sódica
CO₂	Dióxido de carbono
COMT	Catecol-O-metiltransferasa
COX	Ciclooxigenasa
COX-1	Ciclooxigenasa-1
COX-2	Ciclooxigenasa-2
C_T	Valor de ciclo umbral (<i>Cycle threshold</i>)
Cys-DA	5-S-cisteinildopamina
Da	Daltons
DA	Dopamina
DDC	Dopadescarboxilasa
DEPC	Dietilpirocarbonato
Δ^9-THC	Delta-9-tetrahidrocannabinol
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DOPAL	3,4-dihidroxifenilacetaldehído
DPPH	Radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EA	Enfermedad de Alzheimer
e.e.m.	Error estándar de la media
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EP	Enfermedad de Parkinson
ER	Retículo endoplásmico (<i>Endoplasmic reticulum</i>)
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
F1	Fase 1
F2	Fase 2
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FBS	Suero fetal bovino (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FST	Prueba de natación forzada
FU	Unidades de fluorescencia
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial (<i>Glial fibrillary acidic protein</i>)
Glu	Glutamato
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G

GPX	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación
GSK-3β	Glucógeno sintasa cinasa 3 β
H	Histamina
HETEs	Ácidos hidroxieicosatetraenoicos
17βHSD3	17- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 3
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
HNE	4-hidroxinenal
HO-1	Hemooxigenasa 1
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HVA	Ácido homovanílico
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
5-HT	Serotonina
IAChe	Inhibidor de acetilcolinesterasa
ICOMT	Inhibidor de la catecol-O-metiltransferasa
IDDC	Inhibidor de dopadescarboxilasa
IFN-γ	Interferón γ
IL	Interleucina
IMAO	Inhibidor de la monoaminoxidasa
IMAO-A	Inhibidor de la monoaminoxidasa A
IMAO-B	Inhibidor de la monoaminoxidasa B
IP3	Inositol trifosfato
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
i.p.	Intraperitoneal
K_m	Constante de Michaelis-Menten
Kg	Kilogramo
L-AAADC	Levoaminoácido aromático descarboxilasa
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LD	Levodopa
LogP	Coefficiente de reparto octanol/agua
LOX	Lipoxigenasa
5-LOX	5-Lipoxigenasa
LPS	Lipopolisacárido
LRRK2	Cinasa repetida rica en leucina 2 (<i>Leucine-rich repeat kinase 2</i>)
LT	Leucotrienos
mAChR	Receptores muscarínicos de ACh
MAO	Monoaminoxidasa
MAO-A	Monoaminoxidasa A

MAO-B	Monoaminooxidasa B
MAP	Proteína asociada a los microtúbulos (<i>Microtubule-associated protein</i>)
MBI	Lesión cerebral mecánica (<i>Mechanical brain injury</i>)
MCI	Defecto cognitivo leve (<i>Mild cognitive impairment</i>)
MCP1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1 (<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>)
MDA	Malondialdehído
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
mg	Miligramo
mGluR	Receptores metabotrópicos transmembranales de glutamato
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MMSE	Mini examen del estado mental (<i>Mini-mental state examination</i>)
5-MNBA	Ácido 5-mercapto-2-nitrobenzoico
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
3-MT	3-metiltiramina
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
mUI	Miliunidades internacionales
MWM	Laberinto de agua de Morris (<i>Morris water maze</i>)
NA	Noradrenalina
nAChR	Receptores nicotínicos de ACh
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF-κB	Factor de transcripción nuclear κ de las células B activadas (<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NFT	Ovillos neurofibrilares (<i>Neurofibrillary tangles</i>)
NGF	Factor de crecimiento nervioso (<i>Nerve Growth Factor</i>)
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAR	Receptor de N-metil-D-aspartato
nmol	Nanomol
NO	Óxido nítrico
nOH	Número de aceptores de hidrógeno
nOHNH	Número de dadores de enlaces de hidrógeno
NOS	Óxido nítrico sintasa

Nrf2	Factor nuclear derivado del eritroide 2 (<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>)
NT	Neurotransmisor
O₂^{•-}	Aniones superóxido
OBJ	Objeto
OFT	Test de campo abierto (<i>Open Field Test</i>)
•OH	Radicales hidroxilo
6-OHDA	6-hidroxidopamina
ONOO⁻	Aniones peroxinitrilo
6-OHDA	6-Hidroxidopamina
3-OMD	3-O-Metildopa
ORT	Test de reconocimiento de objetos (<i>Object recognition test</i>)
P	Nivel de diferencias estadísticamente significativas
PAMPA	<i>Parallel Artificial Membrane Permeation Assay</i>
PAS	Sitio aniónico periférico (<i>Peripheral anionic site</i>)
PG	Prostaglandina
PBL	Extracto lipídico de cerebro porcino (<i>Porcine brain lipid</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
P_e	Permeabilidad efectiva
PGE2	Prostaglandina E2
PHF	Pares de filamentos helicoidales (<i>Pair helical filaments</i>)
PLA2	Fosfolipasa A2
PM	Peso molecular
p.o.	Vía oral
PPARα/γ	Receptor activado por proliferadores peroximales α/γ (<i>Peroxisome proliferator-activated receptors α/γ</i>)
PSEN1	Presenilina 1
PSEN2	Presenilina 2
pTau	Tau hiperfosforilada
p-TrkB	Receptor asociado a tropomiosina cinasa B (<i>Protein-tropomyosin receptor kinase B</i>)
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RAGE	Receptor para productos finales de glucosilación avanzada (<i>Receptor for advanced glycation end products</i>)
REA	Relación estructura - actividad
RESV	Resveratrol
c-RESV	cis-resveratrol
t-RESV	trans-resveratrol
RHM	Mezcla aleatoria de hexámero (<i>Random Hexamer Mix</i>)
RT-HIV1	Transcriptasa inversa del virus de inmunodeficiencia humana 1

SAFE	<i>Scientific Animal Food and Engineering</i>
SAM	S-adenosilmetionina
SD	Desviación estándar (<i>Standard deviation</i>)
Sir2	Sirtuina 2
SIRT1	Sirtuina 1
SOD	Superóxido dismutasa
SNC	Sistema nervioso central
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TMPD	N,N,N',N'-tetrametil- <i>p</i> -fenilendiamina
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α (<i>Tumor necrosis factor α</i>)
TOC	Trastorno obsesivo compulsivo
TPSA	Área de superficie polar topológica (<i>Topological polar surface area</i>)
TR-FRET	Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer
TRPV1	Receptor de potencial transitorio V1 (<i>Transient receptor potential cation channel</i>)
Tx	Tromboxanos
UI	Unidad internacional
UV	Radiación ultravioleta
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas (<i>Vesicular monoamine transporter</i>)
V_{máx}	Velocidad de reacción máxima

RESUMEN DE LA TESIS DOCTORAL





1. RESUMEN DE LA TESIS DOCTORAL

1.1. RESUMEN EN CASTELLANO

Las enfermedades neurodegenerativas son una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en la población de los países desarrollados. Las dos enfermedades más representativas son la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer. Actualmente afectan a alrededor de 50 millones de personas en todo el mundo y, dado que la esperanza de vida está en aumento, se cree que este número se incrementará notablemente en los próximos años. Su tratamiento constituye uno de los retos más importantes en la medicina actual.

Estas enfermedades se caracterizan por una disminución de determinadas poblaciones neuronales que se refleja clínicamente por la aparición de una sintomatología específica. No obstante, a día de hoy, su etiología sigue siendo desconocida. El origen último de las causas involucradas en estas patologías suele residir en procesos poco específicos en los que se implican numerosos factores como la respuesta inmune, la inflamación, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la apoptosis, el funcionamiento de los mediadores celulares o la neurotransmisión. Debido a la compleja etiología de estas enfermedades, hoy se trabaja en el desarrollo de fármacos que sean capaces de actuar sobre múltiples dianas terapéuticas responsables de la patogenia de la enfermedad.

Desde el inicio de la medicina, el mundo vegetal ha desempeñado un papel clave en el desarrollo de fármacos con importantes actividades biológicas. Las cumarinas tienen gran interés por sus demostradas y diversas actividades farmacológicas. Sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, secuestradoras de radicales libres o inhibidoras enzimáticas, entre otras, hacen de ellas *scaffolds* interesantes en la búsqueda de nuevos fármacos. Del mismo modo, estructuras conocidas como el resveratrol y la curcumina también constituyen farmacóforos interesantes para el diseño, síntesis y evaluación farmacológica enfocados en la obtención de nuevas moléculas multidiana.

En la presente tesis doctoral se han estudiado derivados de cumarina (análogos híbridos resveratrol-cumarina, derivados de amidocumarina y análogos híbridos

curcumina-cumarina) con potencial aplicación en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. Así, para estos nuevos derivados de cumarina se ha evaluado: **(i)** su actividad inhibidora sobre las MAO, las ChE, la BACE1, la COX y su capacidad secuestradora de radicales libres; **(ii)** su actividad neuroprotectora frente a H₂O₂ en dos modelos celulares: neuronas de cultivo primario y células de línea SH-SY5Y; **(iii)** su capacidad de neutralización de ERO en células SH-SY5Y; **(iv)** su capacidad de modificar la expresión del ARNm codificante de Nf-κB, Nrf2, Casp3 y TNF-α; **(v)** de forma teórica, se han analizado sus propiedades moleculares y de paso a través de membranas biológicas; **(vi)** para aquellos compuestos que mostraron una mayor potencia como inhibidores de MAO-B se ha estudiado su actividad *in vivo* en ratones modelo de Parkinson en el test de campo abierto; **(vii)** para los que mostraron una mayor potencia como inhibidores de AChE se ha estudiado su actividad *in vivo* en ratones modelo de Alzheimer utilizando el test de reconocimiento de objeto y, en ambos casos, **(viii)** se ha estudiado su biodisponibilidad.

Los resultados obtenidos muestran que los análogos híbridos resveratrol-cumarina presentan un perfil farmacológico más prometedor que los análogos híbridos curcumina-cumarina. Algunos de ellos son candidatos con potencial terapéutico para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la EA o de la EP por su perfil multidiana. Las diferentes sustituciones sobre este esqueleto permiten obtener inhibidores duales MAO-B/ChE, BACE1/COX ó MAO-B/COX muchos de los cuales presentan una acción neuroprotectora con un mecanismo de acción independiente de la inhibición de la actividad enzimática. Un sustituyente benzamido o heteroarilamido en posiciones 3 ó 7 del núcleo de cumarina originó también inhibidores duales MAO-B/AChE o MAO-B/BACE1. Aunque no ha sido posible determinar su biodisponibilidad, los compuestos **MC151** y **MJM470** (inhibidores de MAO-B) resultaron activos en la evaluación *in vivo* en ratones reserpinizados modelo experimental de EP, incrementando la distancia recorrida, velocidad y tiempo en movimiento. **MJM255** (inhibidor de AChE) presentó un efecto similar al de la eserina en la evaluación *in vivo* en ratones modelo experimental de EA.

1.2. ABSTRACT IN ENGLISH

Neurodegenerative diseases are one of the main causes of morbidity and mortality at developed countries. Both of the most representative are Parkinson's Disease and

Alzheimer's Disease. They currently affect approximately fifty million people around the world and, given that life expectancy keeps on getting higher, it is believed that this number will notably increase within the next years. Their treatment constitutes one of current medicine's main challenges.

These diseases are characterised by a decrease of certain neural groups, which clinically reflects with the apparition of a precise symptomatology. Nonetheless, as of today, its aetiology is still unknown. These involved causes origin usually resides on unspecific processes in which many factors are included, such as immune response, inflammation, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, apoptosis, neural mediators functionality or neurotransmission. Due to this disease's complex aetiology, we are currently working on the development of treatments that are able to act over multiple therapeutic targets responsible for the disease's pathogenesis.

From its origins, medicine has always looked at the plant kingdom to look for treatments with important biological activity. The coumarins are of great interest due to their tested and diverse pharmacological activities. Its anti-oxidant, anti-inflammatory, free radicals sequestrant and enzymatic inhibition properties, amongst others, make them interesting scaffolds for the research of new treatments. Also, known structures such as resveratrol and curcumin constitute interesting pharmacophore for the design, synthesis and pharmacological evaluation focused on collecting new multi-target molecules.

On this doctoral thesis, coumarin derivatives (resveratrol-coumarin hybrid analogs, amidocoumarin derivatives and curcumin-coumarin hybrid analogs) with potential neurodegenerative diseases treatment applications have been studied. So, for this new coumarin derivatives it has been evaluated: **(i)** its inhibitory activity over MAO, ChE, BACE1, COX and its free radicals sequestrant property; **(ii)** its neuroprotective activity against H_2O_2 in two cell models: primary culture neurones and SH-SY5Y cells; **(iii)** its ROS neutralising properties on SH-SY5Y cells; **(iv)** its modifying properties for the ARNm expression, codifying of Nf- κ B Nrf2 Casp3 and TNF α ; **(v)** in theoretical form, its molecular and pass properties through biological membranes have been analysed; **(vi)** so the compounds that showed a greater potential as MAO-B inhibitors have been studied in vivo on Parkinson model mice on open field test; **(vii)** for the ones that

showed more potential as AChE inhibitors its activity has been studied *in vivo* on Alzheimer model mice using the object recognition test and in both cases, (viii) its bioavailability has been studied.

The results obtained show that the resveratrol-coumarin hybrid analogs have a more promising pharmacological profile than the curcumin-coumarin hybrid analogs. Some of them are candidates with therapeutic potential for the development of drugs for the treatment of AD or PD due to their multitarget profile. The different substitutions on this scaffold allow to obtain dual MAO-B/AChE, BACE1/COX or MAO-B/COX inhibitors, many of which have a neuroprotective action with a mechanism of action independent of the inhibition of enzymatic activity. A benzamido or heteroarylamido substituent at positions 3 or 7 of the coumarin nucleus also produced dual MAO-B/AChE or MAO-B/BACE1 inhibitors. Although it has not been possible to determine their bioavailability, the compounds **MC151** and **MJM470** (MAO-B inhibitors) were active in the *in vivo* evaluation in reserpinized mice experimental model of PD, increasing the locomotor activity, speed and time in movement. **MJM255** (AChE inhibitor) had an effect similar to eserine in the *in vivo* evaluation in experimental AD mice.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA





2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas suponen desde hace años, junto con las enfermedades vasculares y las oncológicas, la principal causa de mortalidad y morbilidad en la población de los países desarrollados. Entre las enfermedades neurodegenerativas destacan por su frecuencia, morbilidad y complejidad la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP), cuyo conocimiento y tratamiento constituyen uno de los retos sanitarios más importantes en la medicina actual^{1,2}.

La mejora de las condiciones socioeconómicas de la población en los países desarrollados ha supuesto un aumento de la esperanza de vida. Este hecho se ha visto acompañado de un incremento de la prevalencia de enfermedades asociadas a la edad, como son la EP y la EA, que en su conjunto afectan a aproximadamente 50 millones de personas en todo el mundo. Dado que la esperanza de vida continúa en aumento, se cree que el número de pacientes que padezca estas patologías se incrementará notablemente en los próximos años. El curso crónico de este tipo de enfermedades produce un empeoramiento de los pacientes paulatino pero imparable, cuyo último escalón es la muerte, pero su impacto destructivo es también enorme en las familias de los afectados y en los sistemas de salud^{1,2}.

A pesar de las diferencias existentes entre estas enfermedades, ambas se caracterizan por una disminución de determinadas poblaciones neuronales, que se refleja clínicamente en la aparición de una sintomatología específica como la modificación en el control y coordinación del movimiento en la EP o las alteraciones en los procesos de memoria y lenguaje en la EA^{3,4}. Sin embargo, la causa última del inicio del desarrollo de estas enfermedades todavía no está clara; tampoco existen métodos de cribado eficaces para detectar las fases más tempranas de las mismas o biomarcadores específicos que ofrezcan información veraz del estado del paciente. En muchos casos, cuando el paciente es diagnosticado de EP o EA, el proceso degenerativo que padece está ya muy avanzado^{5,6}, por lo que la identificación de biomarcadores específicos

presentes en biofluidos y el desarrollo de técnicas de imagen molecular son necesarios y deberían constituir una prioridad en la investigación^{7,8}.

Actualmente, los fármacos aprobados para el tratamiento de estas enfermedades por las agencias reguladoras de medicamentos en Estados Unidos y en Europa, la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) y la *European Medicines Agency* (EMA), no consiguen detener o revertir el proceso sino únicamente retardar su avance. Tampoco existen vacunas para impedir su desarrollo o alternativas no farmacológicas que hayan demostrado su eficacia para prevenir o retrasar la aparición de su sintomatología^{9,10}.

Los fármacos utilizados en la terapéutica actual intentan mantener en el sistema nervioso central (SNC) los niveles de los neurotransmisores que se encuentran afectados, tratando así de retardar la aparición o paliar el progreso de la sintomatología. La acetilcolina (ACh) en la EA y la dopamina (DA) en la EP constituyen los neurotransmisores más afectados^{9,10}. Por ello una de las líneas de actuación más avanzada hasta el momento se basa en la inhibición de alguna de las enzimas implicadas en su catabolismo: inhibidores de colinesterasas (ChEs) para el tratamiento de la EA o inhibidores de la isoforma B de la monoaminoxidasa (MAO) para el tratamiento de la EP. Además, la degradación de monoaminas genera altos niveles de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y radicales libres oxidativos, que se relacionan con el desarrollo de estrés oxidativo que conduce a la apoptosis neuronal¹¹⁻¹³.

En la EP, se sabe que los cuerpos de Lewy (inclusiones intracitoplasmáticas formadas por acumulación de la α -sinucleína), que conducen a la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra que proporcionan inervación al cuerpo estriado, son responsables de, al menos, parte de los síntomas de esta enfermedad^{14,15}.

En la EA, las placas de β -amiloide (A β) extracelulares y los ovillos neurofibrilares intraneuronales (NFT) constituyen los rasgos microscópicos más relevantes. El procesamiento alterado de la proteína amiloide a partir de su precursor, la proteína precursora de amiloide (APP) por la acción de la enzima β -secretasa (BACE1), y la hiperfosforilación de la proteína Tau, que da lugar a los NFT, ocasionan, entre otros efectos, la muerte neuronal en diferentes áreas del cerebro, destacando la muerte de neuronas colinérgicas en los núcleos de la base del prosencéfalo¹⁶.

Las anomalías proteínicas que caracterizan estas enfermedades pueden estar presentes antes del inicio de los síntomas clínicos de las mismas¹⁷⁻¹⁹. La propagación de proteínas patológicas que se produce célula a célula y el depósito de las mismas, que parecen seguir rutas anatómicas, sugiere que las proteínas asociadas con enfermedades neurodegenerativas se propagan en el sistema nervioso como si se tratase de priones²⁰.

Aunque no se conoce con exactitud el origen último de las causas involucradas en estas patologías, parece residir en procesos poco específicos en los que se implican numerosos factores como la respuesta inmune, la disfunción mitocondrial, la excitotoxicidad, la inflamación, la apoptosis o el estrés oxidativo, generando un cuadro complejo en el que existen multitud de factores implicados e interconectados entre sí^{21,22}.

En los últimos años, el principal objetivo del abordaje de ambas enfermedades ha consistido en desarrollar fármacos que permitan no sólo actuar sobre la sintomatología, sino detener la muerte celular y fomentar la recuperación de las poblaciones neuronales ya afectadas, modulando las rutas bioquímicas implicadas en estos procesos²³.

Debido a la compleja etiología de estas enfermedades, hoy se trabaja en el desarrollo de fármacos que sean capaces de actuar sobre múltiples dianas terapéuticas responsables de la patogenia de la enfermedad.

Desde el inicio de la medicina, el ser humano ha recurrido al mundo vegetal en busca de remedios o soluciones para sus dolencias o malestares, pues es una fuente inestimable de sustancias con actividades biológicas e importantes propiedades farmacológicas. Además, no sólo es relevante la incorporación de principios activos obtenidos de plantas, sino también el hecho de que muchas de las moléculas extraídas de estas sustancias vegetales constituyen prototipos o cabezas de serie interesantes para un desarrollo posterior. La farmacomodulación ha permitido introducir modificaciones químicas en la estructura de partida con el objetivo de potenciar una determinada actividad biológica y así obtener fármacos más potentes, más selectivos y más seguros.

En esta memoria centraremos nuestra atención en tres moléculas de origen natural sobre las que se han realizado múltiples estudios por su potencial interés farmacológico: la cumarina, el resveratrol y la curcumina.

Las cumarinas (2H-1-benzopirán-2-onas) son metabolitos muy comunes en las plantas, de gran interés por sus muchas y diversas actividades farmacológicas, que disfrutan de una posición ventajosa en el descubrimiento de fármacos. Tomando estos productos naturales como cabezas de serie y dadas sus características físico-químicas y su sencilla y versátil farmacomodulación, muchos investigadores utilizan este *scaffold* privilegiado para diseñar y sintetizar numerosos análogos y derivados^{24,25}. Como consecuencia, se ha obtenido un gran número de derivados de cumarina que han sido evaluados en diferentes dianas farmacológicas, demostrando, entre otras, propiedades como inhibidores enzimáticos selectivos, antioxidantes, antiinflamatorios, vasodilatadores, anticoagulantes o estimulantes del SNC^{24,25}.

En los últimos años, además, se ha visto que hay cumarinas simples con sustituyentes en distintas posiciones de su estructura, que presentan diversas propiedades farmacológicas como inhibidores de MAO, inhibidores de ChEs, inhibidores de la agregación de A β , o antioxidantes con capacidad para neutralizar especies reactivas de oxígeno. Estas actividades dotan a estas pequeñas moléculas sintéticas de un perfil multidiana adecuado para el tratamiento de enfermedades multifactoriales como son la EP y la EA²⁶.

El *trans*-resveratrol (3,4',5-trihidroxi-*trans*-estilbeno, *t*-RESV) es un polifenol abundante en las uvas, que ha demostrado numerosas actividades farmacológicas en estudios *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*. Esta fitoalexina natural exhibe un amplio rango de actividades biológicas entre las que destacan sus propiedades farmacológicas anticancerígenas, cardio y neuroprotectoras y antioxidantes^{27,28}. El resveratrol (RESV) exhibe protección contra muchas enfermedades del SNC como la EA, modulando multitud de cascadas moleculares así como la expresión de algunos genes. Además, sus beneficios neuroprotectores son de gran interés, pues este polifenol es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y es soluble en agua, características ambas muy importantes en la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas²⁹⁻³¹.

La aplicación terapéutica del RESV se vio dificultada por su baja biodisponibilidad. Por esta razón, durante las últimas décadas, investigadores de todo el mundo intentan diseñar y sintetizar derivados del RESV que mantengan o incrementen sus actividades farmacológicas al tiempo que mejoren su biodisponibilidad³².

La curcumina es un curcuminóide de origen natural obtenida de *Curcuma longa* L., planta conocida como cúrcuma en la medicina tradicional ayurvédica. El interés en el uso terapéutico de la cúrcuma y la relativa facilidad de aislamiento de los curcuminoides ha llevado a su extensa investigación³³.

Esta molécula multirringada ha mostrado actividad antiinflamatoria a través de la supresión de numerosas vías de señalización celular, activando otras e incluso llevando a cabo procesos de inhibición enzimática. Dentro de la supresión de vías de señalización se incluye, por ejemplo, tanto la del factor de transcripción nuclear kappa de las células B activadas (NF- κ B), como la de la expresión de la ciclooxigenasa (COX). Sobre esta enzima, además, se ha demostrado que también presenta actividad inhibitoria. En el caso de la activación de vías de señalización celular, destaca la del factor nuclear derivado del eritroide 2 (Nrf2).

Numerosos estudios han demostrado que la curcumina presenta actividades interesantes en enfermedades crónicas como cáncer, diabetes, problemas cardiovasculares y enfermedades neurológicas, entre otras. En lo referente a su interés para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas se sabe que inhibe la formación y promueve la desagregación de las placas de A β , atenúa la hiperfosforilación de Tau y mejora su aclaramiento, inhibe la acetilcolinesterasa (AChE), y es antioxidante³⁴. Además, este compuesto presenta sinergia con otras estructuras como el resveratrol o las catequinas³⁵.

La curcumina presenta numerosos problemas de estabilidad y su eficacia *in vivo* tiene un margen de mejora considerable. Desde hace años, varios grupos de investigación trabajan en el desarrollo de nuevos fármacos con estructura análoga a la curcumina que mantenga o mejore sus actividades farmacológicas y que, además, mejoren la solubilidad y la biodisponibilidad de la molécula³⁶.

2.2. ENFERMEDAD DE PARKINSON

La EP fue descrita por James Parkinson en 1817 con el nombre de parálisis agitante³⁷. Es una enfermedad neurológica idiopática que afecta a entre seis y diez millones de personas en todo el mundo. Además, se calcula que dado el envejecimiento de la población el número de afectados se duplicará en 20 años y que se triplicará en 2050^{2,38}.

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, por detrás de la EA^{39,40}. La incidencia de la EP es de 10–18 por 100.000 personas/año⁴¹. Su prevalencia es mayor en Europa (66–1.500 por 100.000 habitantes⁴²), Estados Unidos (111–329 por 100.000 habitantes⁴³) y América del Sur (31–470 por 100.000 habitantes⁴⁴) que en África (10–43 por 100.000 habitantes⁴⁵), Asia (15–119 por 100.000 habitantes⁴⁶) o los países árabes (27–43 per 100.000 habitantes⁴⁷)⁶.

La EP se caracteriza clínicamente por trastornos motores como bradicinesia (lentitud de movimientos), que en fases avanzadas puede llegar a la acinesia (ausencia de movimientos conscientes normales), rigidez, temblor en reposo, que remite o se reduce durante el movimiento voluntario, y alteración de los reflejos posturales, cuya consecuencia son la inestabilidad y las caídas frecuentes^{6,14,48,49}.

Otros síntomas que aparecen durante el desarrollo de la enfermedad son menos frecuentes, pero contribuyen a deteriorar la calidad de vida del paciente. Entre ellos destacan las alteraciones cognitivas (demencia, pérdida de memoria), de la percepción (alucinaciones, delirio, falsas percepciones), de la emotividad (depresión), de los patrones del sueño, gastrointestinales (sialorrea, disfagia) y cutáneos (sudoración excesiva, seborrea) y la posible presencia de dolor muscular y neuropático^{4,10,62-65}.

Estos síntomas no motores son comunes al inicio de la enfermedad y están asociados con una reducción de la calidad de vida del paciente. Además, suelen presentarse antes de la aparición de los síntomas motores clásicos⁵⁰. De hecho, se ha visto que los trastornos del estado de ánimo y el estreñimiento casi duplican el riesgo de un individuo de desarrollar posteriormente la EP⁵¹.

La fase premotora o prodrómica suele ser prolongada, con un periodo de latencia de 12 a 14 años entre la aparición de estos síntomas y los posteriores síntomas motores. Aún así, se presume que los procesos patológicos están en marcha en la fase premotora, lo que proporciona una potencial ventana temporal en la que, de detectarse inequívocamente que se deben a la EP, podrían llevarse a cabo terapias que busquen prevenir o retrasar el desarrollo y la progresión de la enfermedad^{50,51}.

El riesgo de desarrollar la EP es claramente multifactorial. Aunque en un primer momento se asoció principalmente a factores ambientales, posteriores investigaciones evidenciaron que la enfermedad se desarrolla a partir de una complicada interacción entre factores genéticos y factores ambientales⁴⁸.

Existen diferentes factores de riesgo como por ejemplo el género o la etnia. En el caso del género se ha establecido la relación de aproximadamente 3 hombres con la EP por cada 2,28 mujeres, por lo que el género masculino presentaría un condicionante de mayor riesgo que el femenino. De igual forma, la etnia también parece ser un factor de riesgo pues si analizamos la incidencia en Estados Unidos, es más alta en personas de origen hispano seguida de blancos no hispanos, asiáticos y personas de raza negra. Aun así, el mayor factor de riesgo para la EP es sin duda alguna la edad. La prevalencia e incidencia aumentan casi exponencialmente con la edad^{52,53}.

Otros factores de riesgo para la EP incluyen exposiciones ambientales como la exposición a pesticidas, lesiones previas en la cabeza, uso de β -bloqueantes, ocupación agrícola y consumo de agua de pozo (listados en orden decreciente de fuerza de asociación). Además, algunos estudios epidemiológicos sugieren que el uso de antipsicóticos, específicamente fenotiazinas, benzamidas, haloperidol o risperidona, por personas mayores y la exposición a disolventes, particularmente tricloroetileno, podría aumentar el riesgo de padecer la EP; sin embargo, se necesitan estudios adicionales para confirmar estas asociaciones^{54,55}.

Por otro lado, se encontraron factores asociados a una disminución del riesgo de padecer la EP como el consumo de café, los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), el uso de bloqueantes de los canales de calcio y el consumo de alcohol (listados en orden decreciente de fuerza de asociación). También se señaló el tabaco como un

posible factor que disminuía el riesgo de padecer la EP; sin embargo, son necesarios nuevos estudios para dilucidar este hecho⁵⁶.

La contribución de la genética al desarrollo de la EP constituye, junto con la edad, el mayor factor de riesgo, especialmente si existen antecedentes familiares de EP o temblor. El primer gen asociado con la EP hereditaria⁵⁷ fue el SNCA, que codifica la proteína α -sinucleína. Las causas más comunes de herencia dominante y recesiva de la EP son las mutaciones en la cinasa repetida rica en leucina 2 (LRRK2) y parkina, respectivamente. El principal factor de riesgo genético para desarrollar la EP es la mutación en GBA, que codifica la β -glucocerebrosidasa, enzima deficiente en la enfermedad de Gaucher⁵⁸.

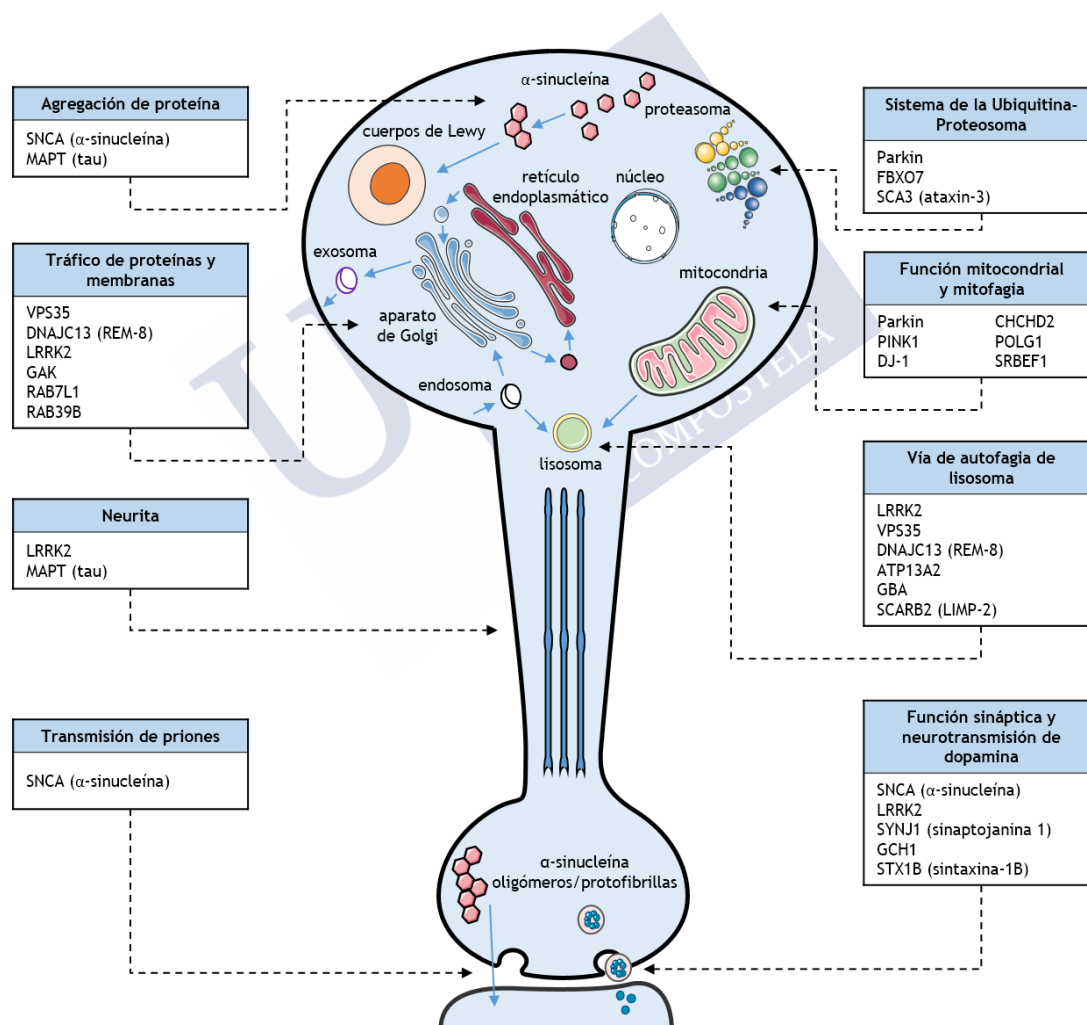


Figura 1. Genes implicados en la EP en base a mutaciones identificadas como causas de la EP familiar o polimorfismos que se encuentran como factores de riesgo para la EP esporádica. Los productos genéticos impulsan procesos celulares clave que podrían ser la base de la patogénesis de la EP. Imagen modificada de Kalia et al [6]. Elaboración propia a partir de imágenes creadas por Servier y disponibles en www.smart.servier.com. Licencia Creative Commons 3.0

En la última década, casi 900 estudios genéticos han tratado de asociar decenas de potenciales *loci* genéticos con la EP. Un reciente metaanálisis⁵⁹ de estudios de asociación de genoma completo (dato de pacientes de ascendencia europea con EP) reveló que 24 *loci* tienen una asociación clínicamente significativa con el riesgo de enfermar (**Figura 1**). Estos *loci* incluyen GBA así como genes asociados con formas monogénicas de EP (LRRK2 y SNCA)^{58,60}.

La EP afecta a los núcleos basales y su origen neuroquímico fue descubierto por Hornykiewicz en 1960, cuando demostró que la cantidad de DA era muy escasa (en general, menos del 10% de la normal) en la sustancia negra y en el núcleo estriado de los cerebros *post mortem* de pacientes con EP; esto se asocia a una pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y a degeneración de las terminaciones nerviosas en el estriado⁶¹.

A pesar de que las causas últimas de la EP no se conocen todavía, la pérdida de neuronas dopaminérgicas se ha asociado con diferentes mecanismos de daño celular como la homeostasis irregular del calcio, la disfunción mitocondrial, la inflamación y la agregación desordenada de proteínas⁴⁸ que conducen a la excitotoxicidad y a la apoptosis celular⁴⁹.

La pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra que proporcionan inervación dopaminérgica al cuerpo estriado junto con la aparición de inclusiones intracitoplasmáticas, denominadas cuerpos de Lewy, son aspectos fisiológicos del envejecimiento, pero en los pacientes afectados por esta enfermedad la pérdida es más rápida y precoz⁴⁹.

Se sabe que los cuerpos de Lewy están formados por la α -sinucleína, una proteína neuronal formada por 140 aminoácidos. En la EP, esta proteína origina oligómeros patológicos y forma agregados que precipitan y dan lugar a los anteriormente mencionados cuerpos de Lewy⁶².

El estrés oxidativo es el resultado del desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) y su tasa de eliminación, que da lugar a su acumulación en la célula y los efectos derivados de la

misma. De forma general, se puede englobar dentro de la terminología de ERO a los radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), los aniones superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$) y el H_2O_2 . En el caso de las ERN, estas incluyen radicales libres como el óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$) y su derivado, el anión peroxinitrito (ONOO^-). Tanto las ERO como las ERN poseen la capacidad de oxidar macromoléculas e incluso interrumpir la función celular. Como mecanismos de defensa antioxidante celular se incluyen proteínas antioxidantes, como glutatión (GSH), α -tocoferol, ácido ascórbico y enzimas de eliminación de radicales de oxígeno, incluidas la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, peroxidasa y tiorredoxinas⁶³.

Es importante señalar que los radicales libres oxidativos son un subproducto inevitable del metabolismo celular, lo que indica que para la supervivencia celular es necesaria una cierta cantidad de ERO y ERN, pues están implicadas en la regulación de diversos procesos fisiológicos que van desde la propagación celular hasta la apoptosis. Sin embargo, en condiciones patológicas, cuando existe una cantidad exagerada de ERO y de ERN superior a la capacidad de neutralización de los antioxidantes celulares, aparece el daño oxidativo que se puede producir en proteínas, lípidos y ácido desoxirribonucleico (ADN) y, en última instancia, conducir a la citotoxicidad e incluso a la carcinogénesis⁶³.

El envejecimiento, uno de los factores de riesgo más significativo de la EP, como ya se ha comentado previamente, está asociado al estrés oxidativo y a la disfunción mitocondrial.

La evidencia directa inicial de ERO en la etiología de la EP es consecuencia de la detección *post mortem*, mediante inmunohistoquímica de aductos, de 4-hidroxinenal (HNE) en las neuronas nigrales del cerebro de pacientes con EP, que se confirmó en varios estudios de seguimiento que muestran un aumento en los niveles de hierro y una disminución en los niveles de GSH en la sustancia negra de los cerebros de los pacientes con EP⁶⁴.

Un metanálisis reciente reveló, por un lado, aumentos significativos en los marcadores de estrés oxidativo, tales como la 8-oxo-2'-desoxiguanosina, el malondialdehído (MDA), nitrito y ferritina, en los pacientes de EP. Por otro, también se

observó una regulación negativa de antioxidantes como la catalasa, el ácido úrico, GSH y colesterol total en sangre respecto a individuos sanos⁶⁴.

La hipótesis del catecolaldehído plantea que las enfermedades que presentan neurodegeneración catecolaminérgica son el resultado de interacciones dañinas entre 3,4-dihidroxifenilacetaldehído (DOPAL) –producto de la metabolización de la DA por acción de la MAO– y la proteína α -sinucleína, un componente importante de los cuerpos de Lewy en enfermedades como la EP⁶³.

La MAO es una flavoenzima que cataliza la desaminación oxidativa de las aminas exógenas y endógenas, incluyéndose, por tanto, los neurotransmisores. En las neuronas monoaminérgicas, la MAO está presente en la membrana mitocondrial externa. Presenta dos isoformas diferentes, que difieren en su selectividad frente a los sustratos, sobre los que llevan a cabo las reacciones de desaminación, y su sensibilidad a los diferentes tipos de inhibidores. La MAO-A presenta una mayor afinidad y selectividad por los neurotransmisores serotonina (5-HT) y noradrenalina (NA), mientras que la MAO-B la presenta por el neurotransmisor DA⁶⁵. Actualmente los inhibidores selectivos sobre la isoforma A de la MAO se utilizan como antidepresivos, mientras que los que presentan selectividad sobre la isoforma B se están utilizando en combinación con levodopa (LD) para el tratamiento de la EP⁶⁵.

La oxidación de la DA produce H_2O_2 y DOPAL por acción de la MAO⁸⁵, lo que da lugar a la inducción de estrés oxidativo, perjudicial para las neuronas dopaminérgicas⁸⁷. Generalmente el DOPAL es metabolizado por acción de la aldehído deshidrogenasa (ALDH) a ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), el cual rápidamente es capaz de excitar las células. El DOPAL también reacciona con el H_2O_2 (producido simultáneamente con el DOPAL cuando la MAO metaboliza la DA citoplasmática) para formar radicales hidroxilo⁶³.

Estos radicales hidroxilo peroxidan las membranas lipídicas y el producto de peroxidación lipídica, el HNE, inhibe la ALDH, promoviendo a su vez la acumulación de DOPAL. En última instancia, todo ello conduce a una reducción de la actividad de la glucocerebrosidasa, la disfunción lisosómica, la acumulación de α -sinucleína en las neuronas humanas y a la muerte selectiva de las neuronas en el SNC^{59,65}.

El almacenamiento de DA en vesículas a través del transportador vesicular de monoaminas (VMAT) no solo es necesario para la neurotransmisión dopaminérgica, sino que también constituye un mecanismo protector frente a la toxicidad celular, dado que la DA citoplasmática puede oxidarse espontáneamente para formar una variedad de productos de oxidación potencialmente tóxicos como el aminocromo y la 5-S-cisteinildopamina (Cys-DA).

Los oligómeros de α -sinucleína impiden las funciones vesiculares como la del VMAT, favoreciendo la formación de DOPAL a partir de DA y generando un bucle indeseado que da lugar a radicales libres y citotoxicidad^{63,66}.

La vulnerabilidad intrínseca de las neuronas dopaminérgicas asociada a un deterioro mitocondrial, ineficientes defensas antioxidantes y la maquinaria proteolítica alterada, representa unas condiciones adecuadas para la activación de los fenómenos excitotóxicos mediados por Ca^{2+} y la progresión de la muerte de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales.

Dentro de los ganglios basales están presentes junto con el sistema dopaminérgico otros sistemas de neurotransmisores, como el GABAérgico, el colinérgico y el glutamatérgico. En la EP, la neurotransmisión alterada observada dentro de los ganglios basales afecta el sistema glutamatérgico, lo que sugiere una participación crítica de la excitotoxicidad mediada por glutamato (Glu) en la patogénesis, así como en la progresión del proceso neurodegenerativo subyacente a la enfermedad⁶⁷.

Los niveles excesivos de Glu en la hendidura sináptica causan hiperactividad de los sistemas glutamatérgicos y eventualmente neurotoxicidad, principalmente a través de la sobreestimulación de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA). La estimulación glutamatérgica de los receptores de NMDA provoca su activación y la entrada de Ca^{2+} en la célula. La internalización inicial de Ca^{2+} es seguida por la liberación de Ca^{+2} del retículo endoplásmico (ER) y de las reservas mitocondriales. Este fenómeno también está modulado por los receptores metabotrópicos transmembranales de Glu (mGluR) y es responsable de las cascadas secundarias que involucran calpaínas y la activación de vías que conducen a la muerte celular necrótica o apoptótica. Por lo general, la estimulación intensa de los receptores de NMDA provoca un proceso posterior de

degradación de macromoléculas que finalmente induce la muerte celular necrótica. De manera diferente, la estimulación leve o crónica de los receptores de NMDA activa las vías apoptóticas y, por último, la muerte celular cuando el aumento del Ca^{2+} intracelular excede la capacidad de amortiguación mitocondrial⁶⁷.

Estudios recientes han descrito también la presencia de microglía activada en la sustancia negra y el putamen de pacientes con EP. La activación de microglía libera una variedad de radicales libres y activa varios genes y proteínas, incluyendo iNOS y citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF- α). Estas citocinas activan varias señales en vías de transducción que incluyen MAPK, PI3K/AKT y mTOR, lo que conduce a la activación de NF- κ B que juega un papel clave en la activación y regulación de mediadores durante el proceso inflamatorio⁶⁸.

La EP comienza años antes de que se pueda hacer el diagnóstico y dado que es un trastorno neurodegenerativo de progreso lento, gran parte de los síntomas parkinsonianos debidos a la pérdida de actividad dopaminérgica suelen aparecer cuando se ha perdido entre un 70 y un 80% de la población neuronal. Sin tratamiento, esta enfermedad evoluciona en 5-10 años a un estado de invalidez por acinesia, puede acortar notablemente la esperanza de vida y, desde luego, deteriora la calidad de vida del paciente^{4,49}.

A la complejidad que representa no conocer la causa inicial del desarrollo de la enfermedad, hay que sumar el desafío que supone el hecho de no disponer de un buen método de diagnóstico para las primeras etapas de la enfermedad. Hasta la fecha, el estándar para la confirmación del diagnóstico se ha llevado a cabo por examen patológico en la autopsia, por observación de degeneración de neuronas de la sustancia negra *pars compacta* y la presencia de cuerpos de Lewy.

Pese a que aún no se ha establecido un consenso sobre la clasificación de los subtipos de la EP, las observaciones clínicas empíricas sugieren dos subtipos principales. Por un lado, la EP con temblor dominante, con una relativa ausencia de otros síntomas motores, y la EP con temblor no dominante, que incluye fenotipos descritos como síndrome rígido acinético y trastorno de la marcha e inestabilidad

postural. Un subgrupo adicional de pacientes con la EP presenta un fenotipo mixto o indeterminado con varios síntomas motores de gravedad⁶⁹.

El curso y el pronóstico de la enfermedad difieren entre los subtipos. La EP con temblor dominante a menudo se asocia con una tasa de progresión más lenta y menor discapacidad funcional que la EP con temblor no dominante. Además, existen hipótesis de que los diversos subtipos de la EP tienen un origen etiológico y una patogénesis diferente^{49,69}.

La progresión de la EP se caracteriza por empeoramiento de los síntomas motores, inicialmente tratados con terapias sintomáticas. Sin embargo, conforme la enfermedad avanza, aparecen complicaciones relacionadas ya no solo con la enfermedad en sí misma, sino también con el tratamiento⁴.

En la etapa tardía de la EP, existe una resistencia al tratamiento tanto de los problemas motores como de los no motores. Síntomas como la incontinencia urinaria, el estreñimiento severo y la hipotensión postural son características no motoras comunes de la EP. Aproximadamente dos décadas después del inicio de la enfermedad, hasta el 80% de los pacientes presentan congelación de la marcha y caídas y hasta el 50% de los pacientes también presentan asfixia. La demencia es particularmente prevalente, pues se presenta en el 83% de los pacientes con evolución de la EP durante 20 años⁴.

2.2.1. Dopamina y receptores dopaminérgicos

La DA es el neurotransmisor catecolaminérgico predominante en el cerebro de los mamíferos, donde controla una variedad de funciones que incluyen la actividad locomotora, la cognición, la emoción, el refuerzo positivo, la ingesta de alimentos y la regulación endocrina. A nivel periférico, también está relacionada con funciones tales como la modulación de la función cardiovascular, la secreción hormonal, el tono vascular, la función renal y la motilidad gastrointestinal⁷⁰.

El proceso de síntesis de la DA comienza con el aminoácido L-tirosina, que se encuentra en la sangre. Este aminoácido se puede obtener de la dieta o sintetizarse a partir de fenilalanina por acción de la enzima fenilalanina hidroxilasa. Para la síntesis de DA, el aminoácido L-tirosina debe entrar en las neuronas catecolaminérgicas. Una vez

en su interior, por acción de la tirosina hidroxilasa, enzima específica que se va a encontrar en la fracción soluble del citoplasma y el cofactor tetrahidrobiopterina en presencia de O_2 y Fe^{2+} , va a dar lugar a LD, al transferir un grupo hidroxilo a la posición 3 de la L-tirosina. La LD, por su parte, es sustrato de la enzima levoaminoácido aromático descarboxilasa (L-AADC), también conocida como dopadescarboxilasa (DDC), necesitando la vitamina B6 como cofactor para la reacción. Esta enzima descarboxila la LD dando lugar a la DA⁷⁰. En el proceso de metabolización de la DA existen principalmente dos enzimas a tener en cuenta, la MAO y la catecol-O-metiltransferasa (COMT). El metabolito final de ambas vías es el ácido homovanílico (HVA)⁷⁰, como se observa en la **Figura 2**.

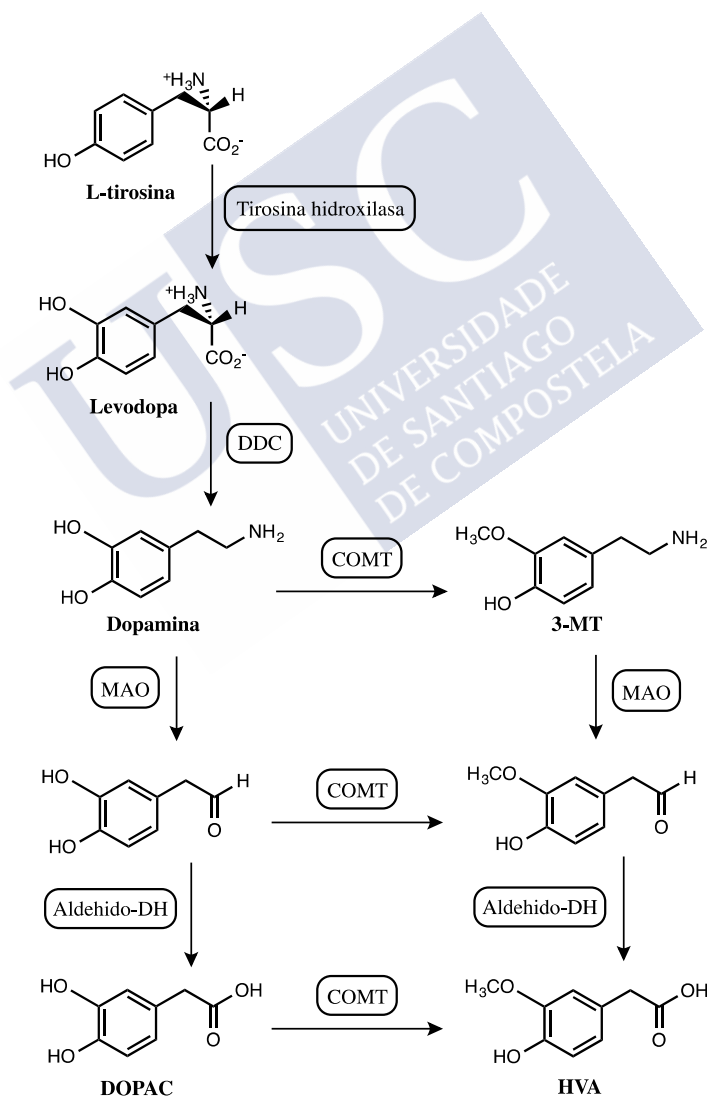


Figura 2. Biosíntesis y metabolismo de la DA

La variedad de funciones fisiológicas controladas por la DA, en el cerebro y la periferia, está mediada por los receptores de DA que son miembros de la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Estos receptores tienen una estructura canónica con siete dominios transmembrana y pueden ejercer su señalización a través de mecanismos dependientes e independientes de proteína G para estimular o inhibir la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPc). Existen cinco tipos de receptores de DA: D₁, D₂, D₃, D₄ y D₅ (codificados en humanos por los genes DRD1, DRD2, DRD3, DRD4 y DRD5, respectivamente) y se clasifican como receptores de clase D₁ –subfamilia D₁– (D₁ y D₅) o receptores de clase D₂ –subfamilia D₂– (D₂, D₃ y D₄)⁷¹.

Además, existen dos variantes principales del receptor D₂ de DA que difieren en la presencia de 29 aminoácidos adicionales en la tercera asa intracelular, presentan propiedades fisiológicas, de señalización y farmacológicas distintas, y se clasifican como D_{2S} (D_{2-corto}) y D_{2L} (D_{2-largo}). Por otro lado, el receptor D₄ en humanos es altamente polimórfico con una región repetida en la tercera asa citoplasmática⁷².

Los receptores de clase D₁ (receptores D₁ y D₅) están acoplados principalmente a proteínas G $\alpha_{s/olf}$ y estimulan la actividad de la adenilciclase (AC) y la producción del segundo mensajero AMPc. Se encuentran en el entorno postsináptico, carecen de intrones en sus regiones de codificación y presentan una homología del 80% en sus dominios transmembrana. El subtipo D₁ es la forma predominante y se localiza en las áreas de proyección dopaminérgica primaria como el cuerpo estriado, el núcleo *accumbens* y las áreas corticales, mientras que el subtipo D₅ se expresa en áreas corticales, subcorticales y límbicas. Actualmente no existe un agente selectivo D₅, ni agonista ni antagonista, que discrimine entre los receptores D₁ y D₅⁷².

En contraste, los receptores de clase D₂ (receptores D_{2S}, D_{2L}, D₃ y D₄) están asociados con proteínas G $\alpha_{i/o}$ que inhiben la producción de AMPc. Los receptores de dopamina D₃ y D₄ son un 75 y un 53% homólogos, respectivamente, con el receptor D₂. Mientras que el dominio terminal NH₂ tiene un número similar de aminoácidos en todos los receptores de dopamina, el terminal COOH para los receptores de clase D₁ es siete veces más largo que el de los receptores de clase D₂⁷³. Estos receptores de DA, además de su acción en la señalización mediada por AMPc, regulan multitud de respuestas

celulares. Dichos mecanismos de señalización pueden involucrar el acoplamiento alternativo de proteínas G, canales iónicos, tirosina cinasas o proteínas clásicamente involucradas en la desensibilización GPCR como las β -arrestinas⁷³.

La DA activa los receptores de dopamina D₁ a D₅ con varias afinidades que van desde el rango nanomolar al micromolar. En general, las diferentes subfamilias de receptores de DA varían significativamente en su sensibilidad a los agonistas y antagonistas de DA. En las últimas décadas, se han sintetizado varios compuestos selectivos para los receptores D₁, D₂, D₃ y D₄ de DA. Sin embargo, ha demostrado ser difícil la obtención de ligandos específicos del receptor D₅⁷³.

2.2.2. Tratamiento farmacológico de la EP

La base del tratamiento actual de la EP es la restitución de la función dopaminérgica mediante el aumento del contenido de DA o el estímulo adecuado de los receptores dopaminérgicos⁷⁴. La elección de una determinada terapia está influida por la fase o estadio de la enfermedad, considerándose la respuesta del paciente, así como otras variables como la edad, la presencia de comorbilidad, la función cognitiva, la discapacidad física, etc^{75,76}.

El tratamiento farmacológico correcto alarga la esperanza media de vida hasta alcanzar la de la población general, pero no se sabe si ese resultado se debe a un efecto neuroprotector sobre neuronas dopaminérgicas o si es una consecuencia derivada de la mejoría en la movilidad^{42,76}.

Dentro de los fármacos que potencian la actividad dopaminérgica, cabe destacar los agonistas de acción directa que estimulan los receptores dopaminérgicos, la LD que en el organismo será transformada en DA y los fármacos de acción indirecta, que reducen el metabolismo de la DA o de la LD, como son los inhibidores de la DDC (IDDC), los inhibidores de la COMT (ICOMT) y los inhibidores de la MAO (IMAO)⁷⁷ (**Figura 3**).

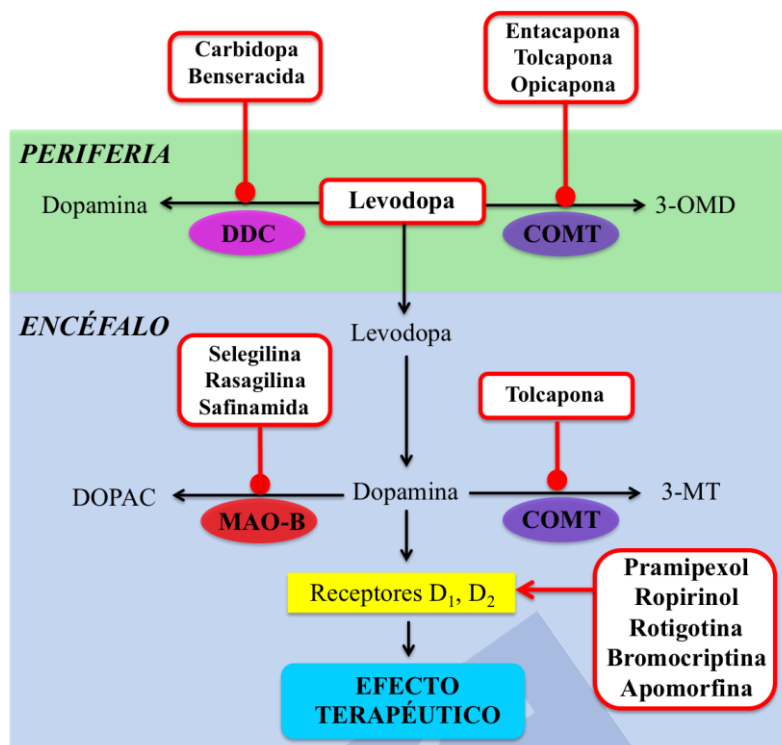


Figura 3. Lugares de acción de los fármacos utilizados para tratar la EP. La LD penetra en el encéfalo y se convierte en DA (el neurotransmisor deficitario). La inactivación de la LD en la periferia se evita con inhibidores de la DDC y la COMT. Por su parte, la inactivación de la LD en el encéfalo disminuye con los inhibidores de la COMT y la MAO-B. Los agonistas de la DA actúan directamente sobre los receptores de DA del estriado. Modificada de Rang & Dale [70]

La LD es un aminoácido producto de la *meta* hidroxilación de la tirosina, presente de forma natural en algunas plantas. Considerada prácticamente inactiva y asumiendo que sus efectos, terapéuticos o adversos, son debidos a su descarboxilación a dopamina, recientemente se ha identificado como candidato para el receptor GPR143 (OA1). La LD es, por el momento, el tratamiento más eficaz en la EP ya que mejora todos los signos y síntomas, y la duración del efecto excede la semivida del fármaco, posiblemente porque la DA se acumula en las terminaciones y se libera según la demanda funcional⁷⁸.

Los IDDC aumentan la biodisponibilidad de la LD, ya que si esta es administrada en monoterapia la biodisponibilidad es baja y sólo el 1% alcanza el SNC. Los inhibidores más utilizados son la carbidopa y la benseracida, que no atraviesan la BHE y actúan impidiendo la transformación de la LD en DA a nivel periférico⁷⁹.

Por otra parte, los ICOMT inhiben, principalmente, la metilación periférica de la LD, aumentando la semivida y disminuyendo los niveles de 3-O-metildopa (3-OMD) siendo la tolcapona, la entacapona y la opicapona los únicos representantes en la práctica clínica⁸⁰.

Los agonistas dopaminérgicos son fármacos como la apomorfina, el pramipexol, el ropirinol y algunos derivados ergóticos como la bromocriptina y la lisurida, que actúan sobre alguno o varios de los cinco tipos de receptores de dopamina.

Los IMAO, preferentemente los que actúan sobre la isoforma B, como el hidrocloreuro de R-(-)-deprenilo (también denominado selegilina), la rasagilina o la safinamida, impiden la metabolización de la DA sin interferir en el metabolismo de otras aminas como NA o 5-HT⁸¹.

La selegilina y la rasagilina suprimen directamente la señal mitocondrial apoptótica, inducen factores anti-apoptóticos como Bcl-2, factores neurotróficos pro-supervivencia y enzimas antioxidantes. Además, se ha visto que la selegilina muestra neuroprotección frente al estrés oxidativo y gran variedad de neurotoxinas lo que podría explicar su capacidad para ralentizar la progresión de los síntomas en la EP⁸² y posiblemente en la EA⁸³. Sin embargo, la formación de metabolitos neurotóxicos, anfetamina y metanfetamina, reduce la intensidad del efecto neuroprotector⁸⁴.

En contraste, se ha visto que la rasagilina no produce estos metabolitos neurotóxicos, ya que el metabolito mayoritario derivado de la rasagilina es el aminoidano, que presenta efecto neuroprotector en varios tipos de cultivos de células neuronales y protege frente al efecto neurotóxico producido por derivados amfetamínicos⁸⁵. La rasagilina proporciona neuroprotección frente a la muerte neuronal al prevenir la caída en el potencial mitocondrial inducido por estrés oxidativo e incrementar tanto el ARNm que codifica la proteína de Bcl-2 como su expresión⁸⁶.

En 2015 la EMA aprobó la safinamida para el tratamiento de la EP, posteriormente en 2017 fue también aprobada por la FDA. La safinamida presenta un modo de acción único que incluye la inhibición selectiva y reversible de la MAO-B, el bloqueo de los

canales dependientes de Na^+ y la modulación de los canales de Ca^{2+} que conducen a la modulación de la liberación anormal de Glu¹¹.

Con respecto a los IMAO es necesario señalar que la inhibición de la MAO disminuye la formación de DOPAL, pero al mismo tiempo aumenta la oxidación espontánea de la DA, por lo que se podría estar cambiando una forma de toxicidad por otra. Además, al inhibirse la vía enzimática de la MAO se favorece la actuación de la otra vía de degradación enzimática mediada por la COMT la cual, al transferir un grupo metilo desde la S-adenosilmetionina (SAM) a la DA, da lugar a la formación de 3-metiltiramina (3-MT), y la SAM se convierte en S-adenosil homocisteína que, finalmente, originará homocisteína que es neurotóxica⁶³.

Los antagonistas de receptores muscarínicos fueron muy utilizados en el tratamiento de la EP antes de la introducción de la LD. Su indicación se basaba en el bloqueo de la actividad colinérgica de interneuronas estriatales, cuya actividad está regulada por las neuronas dopaminérgicas que proyectan desde la sustancia negra. Sin embargo, su uso es cada vez menos frecuente debido a su baja eficacia y a sus frecuentes efectos adversos⁷⁵.

Recientemente se ha introducido en terapéutica el cannabidiol (CBD), comercializado en forma de solución para pulverización bucal. El CBD presenta propiedades antioxidantes y capacidad de activar receptores CB2, pero bloqueando a su vez los receptores CB1. El CBD también es un agonista del receptor de potencial transitorio V1 (TRPV1). Paralelamente, inhibe la hidrólisis enzimática y la absorción de la principal anandamida endocannabinoide, un agonista de los receptores CB1, CB2 y TRPV1. El CBD al unirse a los receptores CB1 localizados en el sistema nervioso, inhibe los impulsos nerviosos que originan los espasmos musculares, mejorando la función motora y la rigidez de las extremidades en los pacientes. Además, se ha comprobado que algunos cannabinoides, entre los que destacan el delta-9-tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), el CBD, el agonista del receptor CB1/CB2 sintético CP55940 y el análogo de la anandamida AM404, actúan como protectores de las neuronas de la sustancia negra contra la muerte causada por diferentes estímulos citotóxicos⁸⁷.

Al decidir el tratamiento inicial para el EP, deben considerarse las reacciones adversas inducidas por los fármacos. Los agonistas de receptores de DA y la LD están ambos asociados con náuseas, somnolencia diurna y edema. A los agonistas de los receptores de DA también se les asocian trastornos de control de impulsos, incluyendo ludopatía, hipersexualidad, bulimia y gastos compulsivos. Por eso deben evitarse en la medida de lo posible en pacientes con antecedentes de adicción, trastorno obsesivo compulsivo (TOC) o personalidad impulsiva, porque estos pacientes tienen un alto riesgo de desarrollar trastornos de control de impulsos³⁹.

Los agonistas de los receptores de DA también son comúnmente asociados con alucinaciones y, por lo tanto, no se suelen prescribir en ancianos con deterioro cognitivo. La LD proporciona el mayor beneficio sintomático, pero a largo plazo el uso está asociado con complicaciones motoras (discinesia y fluctuaciones motoras) por lo que a veces se retrasa su inicio en el tratamiento del paciente. Como alternativa, se puede administrar inicialmente un inhibidor de la MAO-B (IMAO-B).

En los casos en los que ya existe resistencia al tratamiento con LD probablemente existan otros problemas asociados a la muerte de poblaciones neuronales que involucren a otros neurotransmisores; en particular, el descenso en los niveles de ACh debido a la degeneración de neuronas colinérgicas que, a su vez, podría estar asociado a demencia⁸⁸. Como consecuencia, suelen incorporarse inhibidores de las ChEs como rivastigmina⁸⁹ a la terapéutica del paciente. También se verán afectados otros neurotransmisores como Glu, NA y 5-HT, lo que contribuye a los síntomas de la EP.

Los síntomas no motores que se presentan en la EP tienen gran variedad de tratamientos disponibles^{74,90} (**Tabla 1**). La evidencia apoya el uso de antidepresivos tricíclicos, especialmente desipramina y nortriptilina, para el tratamiento de la depresión asociada a la EP. En la práctica, los fármacos más utilizados son los inhibidores selectivos de la recaptación de la 5-HT como citalopram, escitalopram, fluoxetina, paroxetina y sertralina, aunque no existen evidencias que apoyen este tipo de terapéutica.

Además de los ya señalados han demostrado ser eficaces en el tratamiento de la depresión en la EP, una formulación de liberación prolongada de venlafaxina, un

inhibidor de la recaptación de serotonina y noradrenalina⁹¹ y el agonista de dopamina pramipexol⁹².

Tabla 1. Tratamientos farmacológicos para síntomas no motores

Tipo de fármaco		Nombre del fármaco
Deterioro cognitivo		
Demencia	Inhibidor de la AChE	Rivastigmina
Síntomas psiquiátricos		
Depresión	Agonista DAminérgico	Pramipexol
	Inhibidor recaptación 5-HT	Citalopram, escitalopram, fluoxetina, peroxetina, sertralina
	Inhibidor recaptación 5-HT y NA	Venlafaxina de liberación sostenida
	Antidepresivo tricíclico	Desipramina, nortriptilina
Psicosis	Antipsicótico atípico	Clozapina, quetiapina
	Inhibidor de la AChE	Rivastigmina
Trastornos del sueño		
Trastorno del sueño	Benzodiazepina	Clonazepam
	Hormona	Melatonina
Disfunción autónoma		
Estreñimiento	Laxante osmótico	Polietilenglicol
	Activador canales de Cl ⁻	Lubiproston
Motilidad gastrointestinal	Antagonista DA periférico	Domperidona
Hipotensión ortostática	Antagonista DA periférico	Domperidona
	Mineralocorticoide	Fludrocortisona
	Vasopresor	Midodrina
	Inhibidor de la AChE	Piridostigmina
	Profármaco de NA	Droxidopa
Sialorrea	Anticolinérgico	Gotas de atropina, glicopirrolato
	Neurotoxina	Toxina botulínica A y B
Otros		
Fatiga	Estimulante	Metilfenidato, modafinil

La mayoría de los pacientes se ven afectados por interrupciones de los ciclos de sueño-vigilia durante el curso de su enfermedad. A pesar de esto, los trastornos del sueño asociados con estas sinucleinopatías y otros trastornos neurodegenerativos siguen siendo poco referidos por los pacientes y poco reconocidos por los profesionales de la salud. Además, muchas sinucleinopatías tienen aspectos únicos cuando están presentes,

lo que probablemente refleje la interacción de la neurodegeneración específica de la EP con mecanismos que regulan el sueño y el estado de alerta.

La complejidad de la disfunción del sueño en la EP se ve agravada por la influencia de los medicamentos dopaminérgicos y otros medicamentos para la EP. Además, los diferentes trastornos del sueño (trastornos del comportamiento del sueño REM, insomnio, nocturia, disfunción de ritmo circadianos, somnolencia diurna excesiva, entre otras) precisan diferentes métodos de abordaje. Actualmente se suelen utilizar benzodiazepinas como el clonazepam u hormonas como la melatonina para el tratamiento de estas alteraciones⁹³.

El estreñimiento es uno de los síntomas no motores principales en la EP, con una prevalencia que varía del 24,6% al 63% de acuerdo con los diferentes criterios de diagnóstico utilizados para definir el estreñimiento crónico. Además, actualmente se está considerando como un posible factor de riesgo de desarrollar la EP.

El estreñimiento se debe principalmente a un tránsito colónico más lento o a una disinergia puborrectal, pero el uso concomitante de antiparkinsonianos, analgésicos y antidepresivos puede empeorarlo. Para prevenir complicaciones como la oclusión intestinal y para garantizar una respuesta clínica óptima a la LD son fundamentales un diagnóstico preciso y un tratamiento adecuado del estreñimiento, empezando con la recomendación de practicar ejercicio suave y seguir una dieta equilibrada e ingerir suficiente cantidad de líquidos. Los fármacos utilizados para el tratamiento del estreñimiento en pacientes con la EP son laxantes osmóticos como el polietilenglicol o activadores de canales de cloro como lubiproston⁹⁴.

Las terapias disponibles actualmente para la EP solo tratan los síntomas de la enfermedad, por lo que el descubrimiento de fármacos que retrasen o detengan el proceso neurodegenerativo subyacente constituye un objetivo de vital importancia.

Considerando el origen multifactorial en la EP, el paradigma basado en la estrategia de un fármaco–una diana, no parece adecuado para el desarrollo de nuevos fármacos. Una estrategia más efectiva podrían ser los fármacos multidiana actuando sobre varias rutas moleculares disfuncionales.

Las posibles dianas farmacológicas para la modificación de la enfermedad incluyen la neuroinflamación, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo, la actividad de los canales de calcio, actividad de cinasas LRRK2, así como la acumulación de α -sinucleína y su agregación, entre otras^{75,95}. Más recientemente también se ha incluido la terapia génica dirigida^{96,97}. Como alternativa al tratamiento farmacológico, se proponen posibles intervenciones quirúrgicas que incluyen el trasplante de células^{98,99} y la estimulación cerebral profunda de núcleos subtalámicos.

La estimulación cerebral profunda es un tratamiento bien establecido para los síntomas motores de la EP. Varios ensayos clínicos han demostrado que la estimulación del núcleo subtalámico es eficaz en pacientes con EP de moderada a severa. La estimulación cerebral profunda talámica también es una opción para el tratamiento del temblor. Este tratamiento quirúrgico es una opción cuando la enfermedad sigue respondiendo a la LD pero las fluctuaciones y la discinesia se vuelven incapacitantes¹⁰⁰.

El tiempo transcurrido entre el inicio de la enfermedad y el tratamiento quirúrgico, suele ser de unos 10 a 13 años, debido probablemente a la dificultad del procedimiento, el coste del mismo y los riesgos asociados a él. Sin embargo, los resultados de un ensayo aleatorizado multicéntrico, el ensayo EARLYSTIM¹⁰¹, han evidenciado que la estimulación cerebral profunda del núcleo subtalámico en fases más tempranas de la enfermedad (evolución media de la enfermedad de 5 a 7 años y con fluctuaciones motoras durante menos de 3 años) se relaciona con mejor calidad de vida del paciente y reduce varios efectos secundarios. Esto deja clara la perspectiva de que esta estimulación cerebral profunda constituye una mejora en la terapia médica de los pacientes con la EP. Estos resultados probablemente cambiarán la práctica actual de retrasar las intervenciones quirúrgicas¹⁰¹.

2.3. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

En 1906, el médico austríaco Alois Alzheimer describió por primera vez la forma de demencia senil progresiva que lleva su nombre. Gracias a este descubrimiento hoy se sabe que el déficit de memoria y aprendizaje que caracterizan a esta enfermedad no son una manifestación del envejecimiento normal, sino que se deben a procesos patológicos específicos^{5,102}.

La EA es la causa más común de demencia entre las personas mayores de 65 años y afecta a más de 40 millones de personas en todo el mundo^{5,103}. La prevalencia de esta enfermedad en la población de entre 60 y 64 años de edad está por debajo del 1%, pero se duplica cada 5 años a partir de los 65 años, afectando al 47% de las personas mayores de 85 años. Como ocurre con la EP, dado que el porcentaje de personas en la tercera edad se incrementará notablemente en los próximos años, también se incrementarán los pacientes que padezcan la EA. Se estima que el número de personas afectadas por esta enfermedad se triplicará en el año 2050¹⁰⁴.

Para el diagnóstico de la EA, se utilizan actualmente pruebas cognitivas que intentan medir, dentro de una escala, el deterioro cognitivo del paciente. Las más conocidas son el mini examen del estado mental (MMSE®) y más recientemente, la escala de evaluación cognitiva AD (ADAS-cog®)^{105,106}.

La EA es un trastorno neurodegenerativo, progresivo, que se asocia a una alteración global de las funciones mentales superiores y cuyo síntoma cardinal es la pérdida de memoria. Al avanzar la enfermedad se van afectando otras funciones cognitivas, al verse acompañada de un trastorno neuropsiquiátrico progresivo, como las habilidades verbal y visuoespacial, la capacidad para realizar cálculos y para utilizar objetos corrientes. También destacan la apatía y la demencia, y una disminución en la capacidad de realizar las actividades normales de la vida diaria, así como trastornos conductuales progresivos, como agresividad, depresión y destrucción^{5,107}.

El establecimiento de la enfermedad es imparable, y su lenta progresión conduce a trastornos de la función motora y, en último término, a la muerte. El curso de la enfermedad se prolonga aproximadamente una década, aunque ya existen tanto atrofia

tisular como defectos sutiles de la memoria antes de que los síntomas clínicos sean aparentes¹⁰⁸.

Además, dependiendo de las zonas del cerebro que se encuentren más afectadas, se desarrollarán antes unos u otros síntomas; por ejemplo, se ha descrito una correlación entre el hipometabolismo en regiones orbitofrontal y *cingulum* con los delirios que involucran miedo a través de conexiones límbicas^{107,109}.

El riesgo de padecer la EA no depende de un único factor. Es una enfermedad de origen multifactorial, y en su patogenia están implicados factores tanto genéticos, como ambientales y psicológicos. Al hablar de la EA podemos diferenciar aquella que presenta un marcado origen genético (EA de origen familiar) y la EA cuyo origen no se puede asociar a un único factor predominante¹⁰⁷.

La EA de origen familiar se activa por mutaciones en tres genes que codifican la proteína precursora de amiloide (APP) en el cromosoma 21, la presenilina 1 (PSEN1) en el cromosoma 14 y la presenilina 2 (PSEN2) en el cromosoma 1. Estas mutaciones provocan un marcado aumento de la producción del péptido A β con tendencia a agregarse y su depósito en forma de placas en el cerebro, hecho que caracteriza a la EA^{107,109}.

Adicionalmente existe un cuarto gen que codifica la apolipoproteína E (ApoE) y está también relacionado con la EA. Hay tres tipos de ApoE y se sabe que si bien la E2 y la E3 presentan acción protectora frente a la EA, la E4 se asocia a la enfermedad¹¹⁰. Los estudios en humanos indican que la ApoE4 facilita la patología amiloidea, provocando un incremento de los niveles cerebrales de A β ^{111,112}.

Algunos de los factores de riesgo que aumentan la incidencia de la enfermedad son, además, el sexo femenino o el haber sufrido o sufrir ciertas patologías tales como depresión, trauma craneal, diabetes mellitus (DM) o hipertensión e hiperlipidemia entre otros problemas vasculares, obesidad y ciertos hábitos (fumar, baja actividad física, mental y/o social y una dieta inadecuada). No obstante, como ya se ha comentado, el mayor factor de riesgo es el envejecimiento¹¹³.

La diabetes puede afectar directamente al acúmulo de A β en el cerebro, ya que la hiperinsulinemia interrumpe el aclaramiento de A β cerebral al competir con la insulina por el centro activo de la enzima que degrada la insulina^{114,115}.

También la presión arterial alta se puede considerar un factor de riesgo, pues la evidencia sugiere que la hipertensión en la mitad de la vida, y no en la edad avanzada, se asocia con un aumento del 50% del riesgo de sufrir EA y demencia en la edad adulta. La presión arterial elevada, podría disminuir la integridad vascular de la BHE, dando como resultado la extravasación de proteínas en el tejido cerebral, que en consecuencia pueden provocar daño celular, apoptosis y un aumento de la acumulación de A β ¹¹⁶.

Sin embargo, la relación causal entre hipertensión y el posterior deterioro cognitivo está todavía en debate ya que también hay evidencia creciente de que la hipertensión puede ser una respuesta protectora a la hipoperfusión cerebral, por lo que serían necesarios más estudios para aseverar esta relación^{115,117}.

La relación entre la EA y el peso corporal parece asociar la obesidad en la mediana edad con un aumento del riesgo de padecer EA. Aunque los mecanismos subyacentes de esta asociación siguen siendo desconocidos, los estudios sugieren que la resistencia a la insulina y la coincidencia con diabetes mellitus pueden desempeñar un papel relevante en el posterior desarrollo de esta enfermedad neurodegenerativa¹¹⁸. Con respecto a los factores relacionados con el estilo de vida, la asociación entre fumar y el riesgo de EA ha sido controvertido y aún no está claro^{119,120}.

Los estudios epidemiológicos han demostrado que el ejercicio físico tiene un efecto beneficioso sobre la salud del cerebro, que podría explicarse a través de múltiples mecanismos incluyendo la activación de la plasticidad cerebral, la promoción de la vascularización cerebral, la estimulación de la neurogénesis, la reducción de los niveles de inflamación o incluso por la disminución de la tasa de formación de A β . Se ha demostrado que los individuos con altos niveles de actividad física reducen a la mitad el riesgo de sufrir la EA (RR = 0,72 para todas las causas de demencia; RR = 0,55 para EA) en comparación con aquellos que tienen hábitos más sedentarios^{120,121}.

Respecto a la dieta, la adherencia a una dieta mediterránea podría tener un efecto beneficioso sobre la memoria y las funciones cognitiva y visual. Un estudio reciente, PREDIMED, ha evidenciado que una dieta mediterránea suplementada con aceite de oliva o nueces se asocia con una mejora de la función cognitiva^{122,123}.

La dieta es un factor relevante para mantener las capacidades mentales durante el proceso de envejecimiento y es sabido que la desnutrición aumenta el riesgo de desarrollar deterioro cognitivo leve (MCI) y EA. Algunos estudios epidemiológicos relacionados con las causas de las enfermedades neurodegenerativas destacan la influencia de las deficiencias nutricionales en el riesgo de padecer estas enfermedades¹⁵¹. En consecuencia una dieta como la mediterránea, basada en vegetales, antioxidantes y grasas poliinsaturadas, ha sido vista como un elemento que podría disminuir el riesgo de MCI y EA^{122,124}.

La actividad cognitiva, social e intelectual, conjuntamente con la educación superior o el bilingüismo, parece disminuir el riesgo de deterioro cognitivo y demencia, al aumentar la reserva cognitiva y la capacidad del cerebro para resistir los efectos del daño neuropatológico. Los estudios observacionales muestran que en las personas que participan en actividades estimulantes mentales es menos probable desarrollar EA (RR=0,54)¹¹³.

Si bien la etiología de la EA no está todavía claramente definida, se sabe que en su fisiopatología están implicadas diversas alteraciones histopatológicas, especialmente en la corteza, los núcleos basales del prosencéfalo y el hipocampo. Cabe destacar el depósito extracelular del péptido A β en el parénquima cerebral (placas seniles) y en los vasos sanguíneos cerebrales (amiloide vascular) y la formación de NFT de proteína Tau hiperfosforilada (pTau)^{126,127}.

La hipótesis de la cascada amiloide ha sido una de las primeras en formularse para explicar el origen de la enfermedad y una de las que más impacto ha tenido en las últimas dos décadas, tanto en la práctica médica como entre los investigadores de todo el mundo. No es de extrañar, pues, que existan multitud de estudios orientados a intentar explicar la EA enfocándose en el péptido A β y todas sus implicaciones y a tratar de buscar dianas terapéuticas útiles relacionadas con ello¹²⁶⁻¹²⁸.

El péptido A β (**Figura 4**) forma agregados que son responsables de iniciar una cascada patogénica que conduce, en último término a la pérdida de neuronas y a la demencia.

Para el procesamiento de la APP existen dos vías, la vía de la α -secretasa y la vía de la β - y γ -secretasa (**Figura 5**). En la ruta promovida por la BACE1 primero y γ -secretasa después, se libera un péptido A β de entre 37 y 43 aminoácidos de longitud. Aunque la mayor cantidad del producto resultante es A β_{40} , también se genera aproximadamente un 10% de A β_{42} . Recientes estudios afirman que cuanto mayor sea la proporción A β_{42} /A β_{40} , mayor neurodegeneración tendrá lugar, puesto que cuando mayor sea la longitud del péptido, más difícil será su aclaramiento y más se acumulará en el cerebro^{128,129}. De hecho, se ha demostrado experimentalmente que las modificaciones neurofisiológicas que se consideran asociadas con la disfunción sináptica de la EA pueden iniciarse por la exposición neuronal a concentraciones muy pequeñas de oligómeros de A β . Los efectos nocivos sobre las sinapsis y las mitocondrias son causados por el estrés oxidativo inducido por los oligómeros A β_{42} y la hiperfosforilación de Tau¹²⁸⁻¹³⁰.

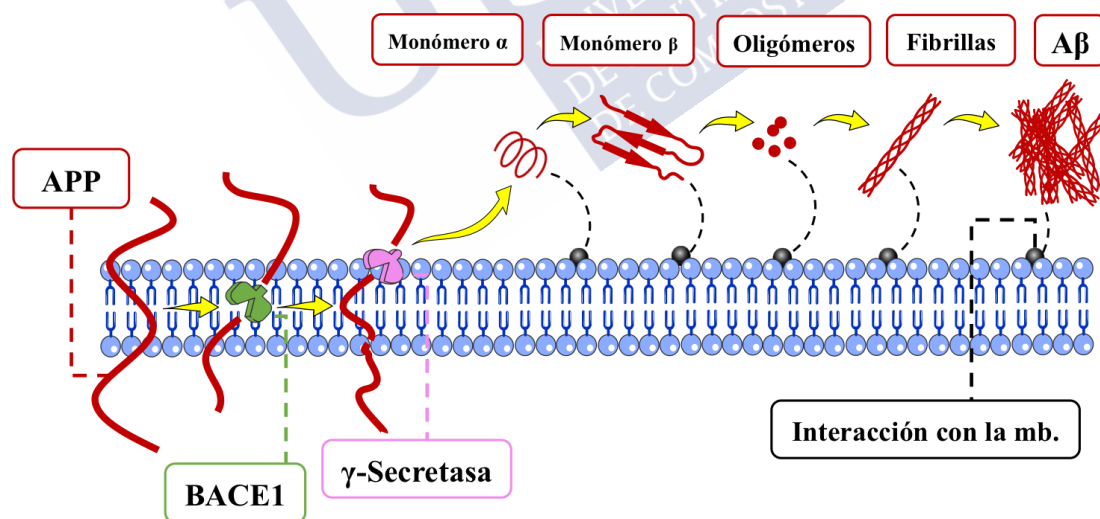


Figura 4. Esquema del proceso de formación de A β . Elaboración propia a partir de imágenes creadas por Servier y disponibles en www.smart.servier.com. Licencia Creative Commons 3.0

Los niveles de A β en el cerebro están regulados por varios mecanismos: aclaramiento fagocítico por la microglia¹³¹ y los astrocitos¹³², transporte a través de la BHE por varios receptores de la superficie celular, incluido el receptor para productos

finales de glucosilación avanzada (RAGE) expresados en el endotelio cerebral y producción o degradación por enzimas^{127,133}.

Cuando se procesa la APP por las secretasas β y γ , la APP causa un almacenamiento exagerado de $A\beta$ en la corteza y el hipocampo en el cerebro con EA. Cuando la proteína $A\beta$ se acumula en el cerebro sufrirá una serie de transformaciones pasando de monómeros α a monómeros β , después a oligómeros que se transformarán en fibrillas insolubles y finalmente darán lugar a las placas de $A\beta$ tan representativas de la EA. Hay estudios que indican la existencia de una correlación entre la cantidad de placas $A\beta$ y el daño neuronal^{128,134}.

Sin embargo, la escisión de la APP por la α -secretasa origina el precursor amiloide soluble α (sAPP α), que tiene algunas actividades neuroprotectoras dado que facilita el crecimiento del axón y reduce la formación de $A\beta$ ¹³⁴. Se ha demostrado que la neurotransmisión mediada por GABA está involucrada en la patogénesis de la EA y tiene un impacto notable en la neurogénesis adulta del hipocampo, que va desde la proliferación de células progenitoras hasta la maduración e integración de nuevas neuronas¹³⁵.

Los depósitos de NFT, formados principalmente por la proteína pTau mal plegada representan otra característica típica de EA. Tau pertenece a la familia de proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP) que es responsable de garantizar la integridad y la estabilidad de los mismos. Los microtúbulos actúan preservando la conformación de las neuronas y, por lo tanto, mantienen el contacto entre las mismas, que es necesario para la transducción de señales pero también para la capacidad de memoria¹³⁶.

Además, Tau contribuye en el transporte de nutrientes esenciales, neurotransmisores y orgánulos a lo largo del axón. Este transporte se realiza de forma bidireccional, tanto desde el núcleo hacia la periferia como desde la periferia hacia el núcleo y por ello es necesario mantener la plasticidad neuronal¹³⁶.

Las cinasas y fosfatasas son las enzimas que controlan la unión de Tau a los microtúbulos. Sin embargo, en la EA, existe un desequilibrio en la acción de las mismas que resulta en la acumulación y agregación crónica de pTau que tiene una menor

afinidad por los microtúbulos. Esto conlleva la despolimerización de los microtúbulos y, en consecuencia, se produce la interrupción del transporte axonal, así como la pérdida de la estructura dendrítica^{136,137}.

Además, dado que pTau presenta una mayor resistencia a las proteasas, esta se acumula secuestrando Tau normal y otras MAP, de forma que poco a poco la función de los microtúbulos se ve aún más comprometida. La pTau origina oligómeros y ovillos amorfos que se desarrollan en pares de filamentos helicoidales (PHF) que precipitan junto con proteínas tales como varias proteínas Tau/pTau modificadas postraduccionalmente en NFT^{138,139}.

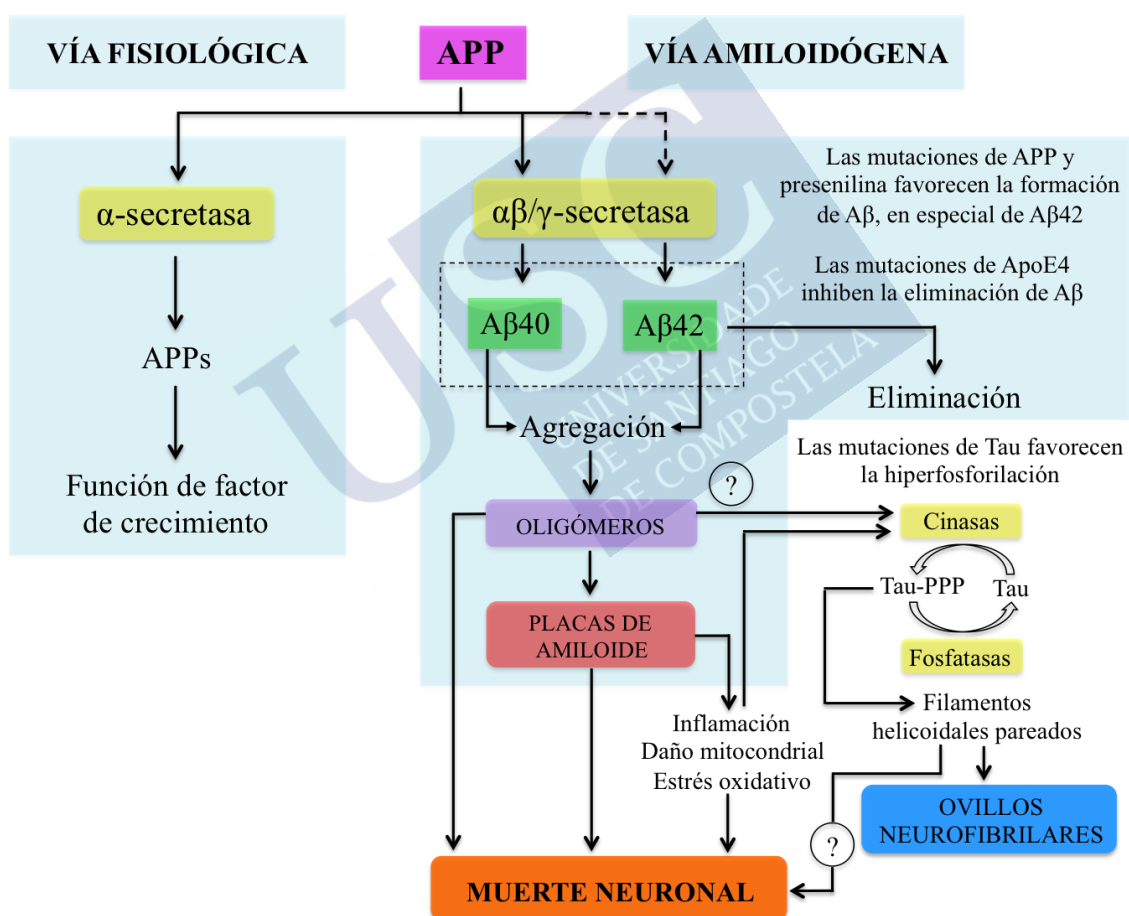


Figura 5. Procesamiento de la APP. Rang & Dale [70]

Los oligómeros de $A\beta_{42}$ y la hiperfosforilación de la proteína Tau causan la pérdida de sinapsis colinérgicas, lo que resulta en una fuerte disminución del tono colinérgico en diferentes áreas cerebrales¹²⁸.

En la actualidad, para explicar la fisiopatología de la EA se han propuesto varios mecanismos adicionales como el estrés oxidativo, la inflamación, la disfunción metabólica, la desregulación de la homeostasis de los iones metálicos y la influencia hormonal, como mecanismos alternativos o combinatorios con A β y NFT¹³⁹.

El estrés oxidativo y la sobreproducción de ERO están asociados con la fisiopatología de los trastornos neurodegenerativos, como se ha comentado previamente, y conducen a lesiones de la membrana neural y deterioro de la memoria⁶³. El tejido cerebral es más susceptible al estrés oxidativo debido a su alta tasa de consumo de oxígeno, baja capacidad regenerativa, alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados y baja concentración de antioxidantes^{63,140}.

Las ERO son factores neurotóxicos importantes liberados por la microglia activada. Las mitocondrias que se dañan durante el estrés oxidativo pueden producir ERO que dañan las proteínas, los ácidos nucleicos y las membranas de ácidos grasos poliinsaturados y causan peroxidación lipídica, pérdida de integridad de la membrana y aumento de la permeabilidad al calcio (Ca²⁺). Las ERO también aumentan la producción de péptidos A β , que inducen estrés oxidativo tanto *in vitro* como *in vivo*¹⁷⁸. Por lo tanto, un círculo vicioso entre la acumulación de ERO y A β conduce a la apoptosis neuronal y acelera la progresión de la EA^{141,142}.

Diferentes estudios epidemiológicos indican que la neuroinflamación ocurre en las primeras etapas de la EA y que puede describirse como una causa y/o un resultado del estrés oxidativo crónico. Esta inflamación conduce a modificaciones en la microglía y también astrogliosis. La activación de las células microgliales induce la producción de ERO (aniones superóxido y radicales hidroxilo), citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- α), quimiocinas y prostaglandinas. Todas estas sustancias promueven la muerte neuronal, lo que lleva a la exacerbación de la patogénesis de la EA^{143,144}.

Todos estos datos apoyan el papel de la inflamación crónica en la patogénesis de la EA, donde podría ser secundaria a la aparición de las placas seniles y los ovillos neurofibrilares y responsable de la neurodegeneración, y/o podría inducir *per se* la formación de estas lesiones, lo que, a su vez, estimularía aún más reacciones inmunoinflamatorias en un proceso autosustentable. Por lo tanto, las COX, enzimas

ubicuas que transforman los ácidos grasos en prostaglandinas (PG) que median los procesos de inflamación, representan una posible diana para el tratamiento de esta enfermedad^{145,146}.

Sin embargo, la activación microglial en la EA puede ejercer también un efecto protector al liberar factores neurotróficos para promover la supervivencia neuronal y parece ser crucial para la fagocitosis de A β y su eliminación del cerebro¹⁴⁶.

El análisis de las placas seniles en pacientes con EA ha permitido la detección de altos niveles de iones metálicos (Cu⁺/Cu²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺/Fe³⁺)¹⁴⁷. Esta desregulación facilita la agregación de A β ¹⁴⁸ y además puede inducir la sobreproducción de ERO a través de reacciones similares a las de Fenton con y sin A β , causando alteraciones en las moléculas biológicas que pueden conducir a la muerte neuronal¹⁴⁹.

También se cree que pueden estar relacionados con la patogénesis de la EA los cambios hormonales durante el envejecimiento. Se ha comprobado que los hombres con EA tienen niveles de testosterona más bajos en cerebro y suero¹⁵⁰; se sabe que esta juega un papel neuroprotector al reducir el estrés oxidativo y los procesos inflamatorios que reducen, a su vez, la hiperfosforilación de Tau y la producción de A β ¹⁵¹. Del mismo modo, los estrógenos han demostrado un papel protector contra la EA ya que están involucrados en la regulación de la cognición, la viabilidad de las neuronas y la acumulación de A β ^{152,153}.

Parece claro que la pérdida neuronal en el cerebro de pacientes con EA afecta especialmente a las neuronas colinérgicas del núcleo basal de Meynert, en el que se ha observado una disminución de colinoacetiltransferasa (CAT), de AChE y del receptor nicotínico para la ACh¹⁵⁴.

Aunque la pérdida de neuronas colinérgicas y una disminución general de la actividad de la CAT parecen tener una relevancia primaria en la patología de la EA, también desempeñan un papel importante en la alteración de los procesos cognitivos otros neurotransmisores como la DA, la NA, la histamina (H) y la 5-HT¹⁵⁵⁻¹⁵⁷.

La serotonina ha sido reconocida como un neurotransmisor con influencia sobre la memoria a corto y largo plazo debido a la activación de receptores específicos de 5-HT, así como a la modulación de otros sistemas de neurotransmisión como el colinérgico, glutamatérgico, dopaminérgico y GABAérgico¹⁵⁶⁻¹⁵⁸.

En el SNC de pacientes con EA el nivel de 5-HT es más bajo, e incluso se observa una proporción inferior de receptores de 5-HT (5HT_{1A}, 5HT_{1B}, 5HT_{1D}, 5HT_{2A} y 5HT₆)¹⁵⁹, afectando en mayor medida a los núcleos del rafe, como se ha observado en estudios *post mortem*¹⁵⁵. La 5-HT, además, presenta acción inhibitoria de la neurotransmisión glutamatérgica en la médula espinal y en el hipocampo. Por lo tanto, un aumento en los niveles de 5-HT en pacientes con EA, específicamente alrededor de las placas de A β , puede jugar un papel beneficioso frente a la neurotoxicidad inducida por NMDA a través de la inhibición de las corrientes de calcio y la hiperpolarización de la membrana^{202,203} constituyendo un mecanismo de protección intrínseco en respuesta al daño excitotóxico inducido por A β en la EA¹⁶⁰.

También se ha observado en estudios recientes una degeneración de las neuronas monoaminérgicas, que se produce por la acumulación de neurotoxinas como A β . En cerebros de pacientes con EA se han encontrado niveles más bajos de DA, LD y DOPAC, especialmente en los núcleos del giro cingulado, amígdala, estriado y rafe^{161,162}.

Además, se han encontrado niveles más bajos de DA, en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y en la orina de pacientes con EA, especialmente en los estadios más avanzados de la enfermedad. Del mismo modo, también se han encontrado niveles más bajos de NA en el hipocampo, la corteza frontal y temporal, el giro cingulado, el LCR y la orina, en los estadios tempranos de la EA^{163,164}.

En la EA, las neuronas productoras de H del hipotálamo posterior muestran una degeneración que conduce a la muerte celular y una disminución en los niveles de H en el hipocampo, la corteza temporal, occipital y frontal. Sin embargo, y quizás por la actividad de la microglía debido a la inflamación, la H está en mayor concentración en LCR y suero de pacientes con EA¹⁶⁵.

La adenosina modula varias funciones sinápticas en el SNC como el sueño y la excitación, la cognición y la memoria, entre otras. Diversos estudios han revelado que existe disminución de la densidad del receptor de adenosina A_1 en el hipocampo en cerebros *post mortem* de pacientes con EA^{166,167}.

2.3.1. Acetilcolina y receptores colinérgicos

Como se ha comentado previamente, uno de los principales neurotransmisores relacionados con la EA es la ACh. Esta se forma a partir de acetil coenzima A (acetil-CoA) y colina por acción de la CAT. Esta enzima, responsable de la síntesis de ACh, se forma en los ribosomas y debe ser transportada hasta la terminal nerviosa donde llevará a cabo su acción, transfiriendo restos acetilo de la acetil-CoA a la colina (**Figura 6**)⁷⁰.

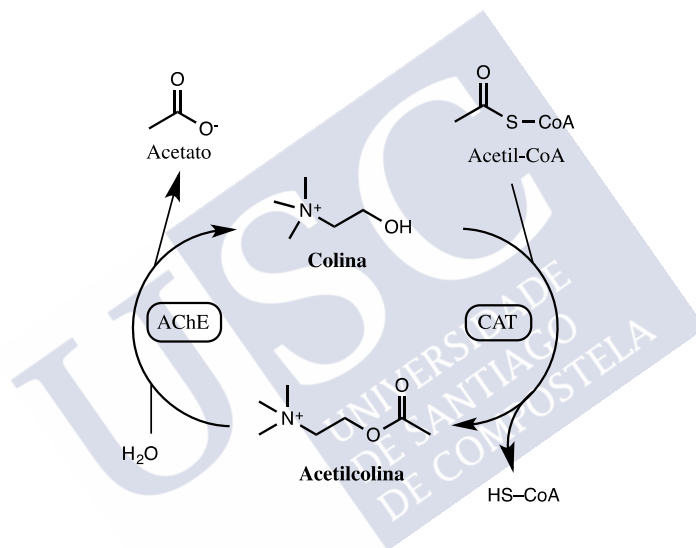


Figura 6. Biosíntesis y metabolismo de la ACh

Las colinesterasas son dos enzimas, la AChE y la butirilcolinesterasa (BuChE), ambas responsables de la hidrólisis de acetilcolina (y también de butirilcolina). La AChE se encuentra principalmente en las uniones sinápticas nerviosas y en áreas que expresan una intensa actividad en la corteza cerebral, mientras que en las células gliales del cerebro predomina la BuChE¹⁶⁸. Ambas juegan un papel muy importante en la transmisión colinérgica⁷⁰.

La AChE y la BuChE comparten el 65% de homología entre sus estructuras. Ambas presentan una tríada catalítica, compuesta por los aminoácidos serina, Glu e histidina, que es esencial para su actividad. Sin embargo, el sitio activo de la AChE presenta un

volumen interno más pequeño que la BuChE, con una gran área catalítica, siendo esta por tanto inhibida por moléculas de mayor tamaño.

En la AChE, el subsitio aniónico está definido por los residuos Trp84, Phe330 y Phe331 e interactúa con la estructura de la ACh a través del grupo amino cuaternario cargado positivamente. Además de los dos subsitios descritos en el centro catalítico, la AChE posee un sitio de unión adicional para la ACh y otros ligandos cuaternarios, que se denomina sitio aniónico periférico (PAS)¹⁶⁸.

En la BuChE el PAS está localizado en la entrada de la cavidad. Los residuos de aminoácidos Asp70 y Tyr332 están involucrados en la unión inicial de los sustratos cargados positivamente.

Se ha observado que en la EA, si bien la actividad de la AChE disminuye en el hipocampo y la corteza temporal, la actividad de la BuChE, sin embargo, aumenta. Diversos estudios han demostrado que la inhibición de la BuChE que se produce con rivastigmina se correlaciona con una mejora de la cognición en pacientes con EA¹⁶⁸.

Los receptores nicotínicos de ACh (nAChR) se subdividen en dos clases fundamentales: musculares y neuronales. Los neuronales, a su vez, pueden estar en la periferia en ganglios del sistema nervioso autónomo, o en el SNC. Todos ellos son estructuras pentaméricas que actúan como canales iónicos controlados por ligandos. Las cinco subunidades que forman el complejo receptor-canal son de estructura parecida y hasta la fecha se han identificado y clonado 17 miembros diferentes de esta familia, denominados α (10 tipos), β (4 tipos), γ , δ y ϵ (uno de cada). Cada una de las cinco subfamilias posee cuatro dominios transmembrana en hélice, y cada una de esas hélices de cada subunidad configura el poro central⁷⁰.

Los receptores muscarínicos (mAChR) son receptores acoplados a proteínas G y se han caracterizado cinco subtipos diferentes (M₁-M₅). Los miembros M₁, M₃ y M₅ se acoplan a proteína G_q para activar la vía de inositol trifosfato (IP₃), mientras que los M₂ y M₄ inhiben la adenilato ciclase a través de G_i y, por tanto, reducen las concentraciones intracelulares de AMPc. Los receptores M₁ en el SNC intervienen en efectos excitadores, como la excitación muscarínica lenta mediada por ACh⁷⁰.

2.3.2. Tratamiento farmacológico de la EA

Dado que en la EA disminuye la actividad colinérgica, no es de extrañar que se recurra a los inhibidores de AChE para intentar mantener los niveles de este neurotransmisor en las sinapsis colinérgicas²². El primer fármaco aprobado por la FDA como inhibidor de la enzima responsable de la degradación de la ACh fue la tacrina. Sin embargo, la tacrina presenta toxicidad hepática, por lo que este fármaco se retiró de la mayoría de los mercados, introduciéndose nuevos medicamentos inhibidores de la AChE que carecen de este efecto adverso^{22,170}.

Los tratamientos actualmente aprobados por la FDA para las manifestaciones cognitivas de la EA incluyen cinco medicamentos^{171,172}. Cuatro de ellos, rivastigmina, galantamina y donepezilo, además de la ya mencionada tacrina, son inhibidores de la AChE. Pese a su extendida utilización estos fármacos actúan sobre la sintomatología, por lo que no revierten la enfermedad ni recuperan las poblaciones neuronales dañadas^{171,172}.

Un gran problema es que solo en un tercio de los pacientes tratados con estos medicamentos muestran efectos beneficios, por lo que los estudios de costo-beneficio de los inhibidores de la AChE no han demostrado rentabilidad. Aún así, siguen siendo el tratamiento de primera línea de esta enfermedad^{173,174}.

Actualmente, el tratamiento estándar de la EA recomienda combinar inhibidores de AChE con memantina¹⁷², un antagonista del receptor de NMDA, que protege las neuronas y reduce la excitotoxicidad al bloquear la estimulación patológica del receptor de NMDA, regulando así la entrada de Ca^{2+} en las neuronas y protegiéndolas de la neurodegeneración. Es el único medicamento autorizado para etapas más avanzadas de la EA que muestra efectividad¹⁷²⁻¹⁷⁴.

Si bien los esfuerzos iniciales en la búsqueda de dianas potenciales para el tratamiento de la sintomatología de la EA se habían centrado mayormente en buscar moléculas capaces de inhibir la AChE, actualmente también se centran en encontrar inhibidores capaces de actuar en el sitio activo de la BuChE. Ya que se ha demostrado la importancia de la inhibición tanto de AChE como de BuChE en la fisiopatología y el tratamiento farmacológico de la EA¹⁶⁹.

Diversos estudios también señalan que el R-(-)-deprenilo, un inhibidor selectivo de la MAO-B con actividad antioxidante (utilizado en la EP), mejora la función cognitiva y la conducta en los pacientes con EA. En estos pacientes la actividad de la MAO está incrementada y esto produce un aumento de los niveles de H_2O_2 y radicales libres que constituyen una fuente de estrés oxidativo para las neuronas vulnerables afectadas por la EA^{13,175}.

Existen otros fármacos como los antioxidantes (vitaminas C y E), los antiinflamatorios, las estatinas y los estrógenos que se suelen asociar al tratamiento de la EA, si bien no constituyen *per se* la terapia farmacológica para esta enfermedad. Con ellos, se intenta que el progreso de la enfermedad sea más lento, tratando de prevenir el deterioro cognitivo¹⁷⁶.

Aún así, y a pesar de todos los fármacos mencionados previamente, la terapéutica de la EA sigue siendo pobre en su eficacia y nula en el tratamiento de la causa. Por ello deben aunarse esfuerzos para tratar por un lado de determinar los factores que dan lugar a esta enfermedad neurodegenerativa y por otro de mejorar la terapéutica disponible para este tipo de pacientes.

Actualmente las estrategias terapéuticas en desarrollo se centran en fármacos que actúen sobre el procesamiento de la APP, inhibidores de la fosforilación y agregación de Tau, inmunización, terapia génica y celular, etc.

Con el objetivo de disminuir la producción de $A\beta$, la investigación se ha centrado en la inhibición de γ y/o β -secretasa y la activación de la α -secretasa. La inhibición inespecífica de la β -secretasa puede dar lugar a efectos adversos ya que esta enzima tiene muchos más sustratos que la APP, entre los que se encuentran la neurorregulina-1, implicada en la mielinización de los nervios periféricos. El desarrollo de inhibidores de la γ -secretasa presenta problemas similares puesto que esta enzima procesa también múltiples proteínas, entre las que se encuentra la Notch, encargada de regular la proliferación celular, el desarrollo, la diferenciación, la comunicación y la supervivencia celular. Para evitar los efectos adversos de los inhibidores de la γ -secretasa, se postularon los moduladores selectivos que bloqueen la enzima alterando el procesamiento de la APP pero sin interferir con la señalización de otras vías. Hasta el

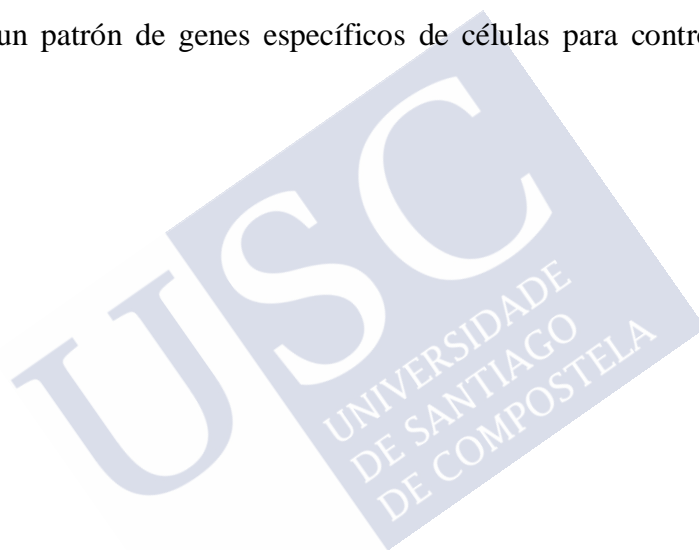
momento, los inhibidores de γ y β -secretasa desarrollados no han conseguido mejorar la cognición respecto al placebo en los pacientes con EA. La activación α -secretasa que conduce al procesamiento no amiloidogénico de la APP resulta una estrategia atractiva; sin embargo no se han encontrado moléculas, en modelos animales, que sean realmente eficaces en esta vía por lo que apenas se encuentran fármacos con este mecanismo de acción en la fase de ensayo clínico.¹⁷⁷

Las estrategias dirigidas a pTau incluyen fármacos que se encuentran actualmente en ensayos clínicos para prevenir la hiperfosforilación, así como aquellos dirigidos a la estabilidad y agregación de los microtúbulos. La hiperfosforilación de Tau es regulada por cinasas y fosfatasas. Por tanto, la inhibición de cinasas o el aumento de la función de las fosfatasas pueden alterar la fosforilación anormal de Tau. Aunque se ha demostrado que el litio y el ácido valproico inhiben la fosforilación de Tau, su beneficio en la función cognitiva es controvertido.¹⁷⁸

La vacunación es otra estrategia para eliminar la Tau del cerebro. AADvac1 es un péptido sintético derivado de los aminoácidos 294 a 305 de la Tau humana, que es el determinante estructural esencial para la interacción patológica Tau-Tau en los NFT; es actualmente el único que ha alcanzado la fase II de ensayos clínicos y continúa en desarrollo.¹⁷⁹ En un estudio preclínico, AADvac1 mejoró la función sensoriomotora y redujo la patología NFT en ratas transgénicas que expresan Tau truncada humana y mostró perfiles favorables de seguridad y tolerabilidad en roedores y animales más grandes^{177,180}.

La inmunización activa para mejorar el aclaramiento de $A\beta$ se ha realizado con $A\beta_{42}$ u otros fragmentos sintéticos, resultando exitosa en modelos transgénicos de la EA. Sin embargo, los ensayos clínicos inicialmente prometedores, han sido parcialmente suspendidos por la aparición de meningoencefalitis en algunos pacientes. Por otro lado, la inmunización pasiva con anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos contra $A\beta$ ha demostrado que además de reducir la carga amiloidogénica neuronal, mejora el déficit cognitivo en animales transgénicos. Sin embargo bapineuzumab y solanezumab, 2 anticuerpos monoclonales que han alcanzado la fase III han terminado fracasando al no mostrar los beneficios clínicos esperados en pacientes con EA leve-moderada ¹⁸¹.

Los esfuerzos pioneros en el tratamiento de la neurodegeneración mediante terapias génicas o el reemplazo celular han mejorado técnicamente, recientemente, en términos de seguridad y eficiencia y se han incorporado a la clínica mostrando resultados alentadores. Se ha encontrado que el trasplante neuronal a menudo está relacionado con la génesis tumoral, mientras que el trasplante de poblaciones más puras de células precursoras mejora los déficits de memoria sin tumores asociados en el hipocampo de ratones. Incluyendo objetivos como la disminución de la patología Tau, los factores de crecimiento neuronal para apoyar las neuronas, el desarrollo de patrones de genes específicos de células para controlar la identidad celular y la modulación de la neuroinflamación para una respuesta inmune adecuada, las terapias basadas en células pueden representar estrategias potenciales en el futuro. En los últimos años, además, se ha desarrollado un patrón de genes específicos de células para controlar la identidad celular¹⁸².



2.4. CUMARINAS

2.4.1. Origen

Las cumarinas (2H-1-benzopiran-2-onas) constituyen un metabolito común en las plantas, aunque su presencia ha sido también detectada en microorganismos y fuentes animales; presentan gran interés por las muchas y diversas actividades farmacológicas que poseen. En las plantas se encuentran en diferentes familias de las Angiospermas, entre las cuales destacan las *Apiaceae*, *Rutaceae* o *Asteraceae*. Aunque están distribuidas en todas las partes de la planta, muestran mayores concentraciones en las frutas y las semillas, seguido de las raíces y las hojas¹⁸³.

La cumarina simple fue aislada por primera vez en 1820 por Vogel¹⁸⁴ del haba tonka (*Dipteryx odorata*), comúnmente llamada *Coumarou*. Desde entonces, investigadores de todo el mundo han logrado aislar o sintetizar y caracterizar miles de compuestos con estructura de cumarina.

Se han aislado también cumarinas en el látex del árbol de la selva tropical *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide*, en el té verde y otros alimentos como la achicoria. También se encuentran altas concentraciones en algunos aceites esenciales como el aceite de casia, el aceite de corteza de canela y el aceite de lavanda. Las condiciones y los cambios estacionales podrían influir en la presencia de las cumarinas en diversas partes de la planta. Su función en las mismas todavía no está clara, aunque se cree que pueden actuar como reguladores del crecimiento, bacteriostáticos, fungistáticos o incluso ser productos de desecho^{185,186}.

La presencia de las cumarinas en la dieta es bastante alta, ya que se encuentran en verduras, frutas, nueces, café y otras semillas, té y vino. Se estima que la dieta occidental promedio puede contener aproximadamente 1 g al día de benzopironas, siendo las estructuras predominantes las cumarinas y los flavonoides. La toxicidad asociada al consumo de las cumarinas en la dieta suscita opiniones contrapuestas, pues algunos investigadores afirman que no existen problemas de toxicidad¹⁸³, mientras que otros aseguran que pueden dar lugar a problemas hepáticos¹⁸⁷. Se ha descrito que esta toxicidad es dependiente del metabolismo y de la especie¹⁸⁸.

2.4.2. Actividad farmacológica

Las cumarinas de origen natural se pueden clasificar en seis tipos de estructuras químicas: cumarinas simples, furanocumarinas, dihidrofuranocumarinas, piranocumarinas (lineales o angulares), fenilcumarinas y biscumarinas¹⁸⁹. Las numerosas actividades farmacológicas evidenciadas por los derivados de cumarina dependen de su estructura central y de los diferentes sustituyentes que presente la molécula^{183,189}. Así, por ejemplo, no tendrán las mismas actividades las cumarinas simples, las cumarinas policíclicas o las biscumarinas.

El tipo de sustituyente y la posición que este ocupe en el núcleo de cumarina determina no solo la potencia de la actividad farmacológica, sino también el tipo de diana específica a la cual se unirá, dando lugar a su perfil biofarmacológico (**Figura 7**)²⁴.

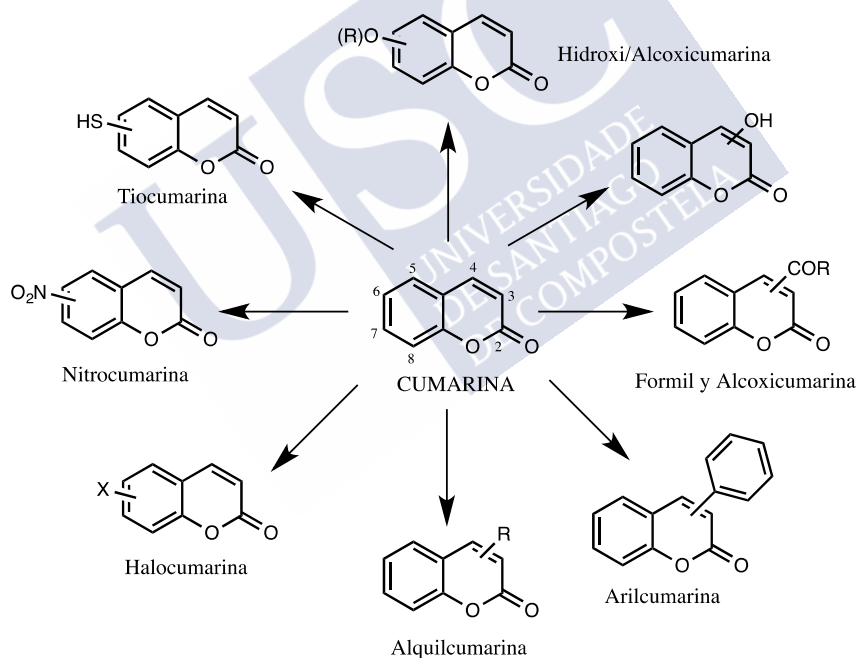


Figura 7. Estructuras químicas de diversas cumarinas simples

Entre las actividades farmacológicas más estudiadas destaca su actividad antibacteriana¹⁹⁰, antifúngica¹⁹¹, antiviral¹⁹², antimutagénica¹⁹³, antioxidante¹⁹⁴, secuestradora de radicales libres¹⁹⁵, antiinflamatoria¹⁹⁶, antitrombótica¹⁹⁷, anticancerígena¹⁹⁶, anticoagulante¹⁹⁸, vasodilatadora¹⁹⁹, estimulante del SNC²⁰⁰ o inhibidora enzimática^{24, 201-205} entre otras.

El anillo de 2H-1-benzopirán-2-ona es plano, aromático y lipofílico y, por lo tanto, capaz de interactuar con muchas dianas biológicas, pues estas presentan por lo general sitios de unión lipofílicos, formando un fuerte enlace hidrofóbico, principalmente por interacciones π - π con aminoácidos aromáticos como pueden ser la fenilalanina, la tirosina o el triptófano. Además, el grupo lactona le confiere a la estructura la capacidad de realizar fuertes enlaces polares, como puentes de hidrógeno o interacciones dipolo-dipolo. Las enzimas con actividad esterasa son capaces de abrir el anillo de lactona, dando lugar, por hidrólisis, a una nueva estructura^{24,183}.

La primera referencia de las cumarinas como agentes terapéuticos data de 1936 de la mano de Von Weder²⁰⁶. Bose en 1958 resumió la mayoría de las propiedades biológicas de las cumarinas naturales²⁰⁷ y Soine en 1964, publicó una revisión sobre los efectos biológicos y farmacológicos de las cumarinas conocidas²⁰⁸. Desde entonces, son muchos los autores en todo el mundo que utilizan la pequeña estructura de la cumarina como *scaffold* para llevar a cabo una farmacomodulación dirigida, buscando nuevos derivados con propiedades farmacológicas, en muchos casos de tipo multidisciplinaria.

En relación con las enfermedades neurodegenerativas, numerosos estudios han demostrado su efecto neuroprotector frente a las ERO y la neuroinflamación. Además, diversas cumarinas presentan actividad inhibitoria de la agregación del péptido A β o inhiben otras enzimas implicadas en la EA o la EP como la MAO^{24,202}, la AChE y BuChE^{24,203}, la COX²⁰⁵ o la 5-lipoxigenasa (5-LOX)²⁰⁴.

2.4.2.1. Actividad antioxidante

En las últimas décadas un número creciente de publicaciones sobre cumarinas y flavonoides ha destacado su actividad antioxidante, considerando los beneficios de su ingestión dietética y el uso farmacológico. Desde que comenzó el interés de la investigación biomédica por las cumarinas, se han evaluado gran cantidad de estos compuestos, tanto naturales como derivados sintéticos simples con varios grupos hidroxilo y distintos sustituyentes para conocer su actividad antioxidante. La actividad antioxidante se debe, en parte, a la capacidad de muchas cumarinas para inhibir la peroxidación lipídica y el secuestro de especies reactivas de oxígeno, como por ejemplo, los radicales superóxido e hidroxilo y el ácido hipocloroso¹⁹⁴.

Numerosas cumarinas han evidenciado perfiles bioquímicos beneficiosos en relación con procesos fisiopatológicos dependientes de ERO²⁰⁹. La posibilidad de deslocalización de radicales en el núcleo de 2H-1-benzopirán-2-ona permite que la mayoría de las cumarinas sean buenos antioxidantes al actuar como captadores de radicales libres, aunque algunas cumarinas (principalmente hidroxycumarinas) también pueden prevenir la formación de radicales libres al quelar iones metálicos²¹⁰.

Varios estudios han demostrado que la capacidad antioxidante de los derivados de cumarina no se basa solo en la eliminación directa de ERO y ERN, sino que también están involucrados otros mecanismos como la quelación de metales como Fe^{2+} y Cu^{2+} (que catalizan la reacción de Fenton) y la inhibición de las enzimas productoras de ERO y ERN como la xantina oxidasa, la mieloperoxidasa y la lipoxigenasa (LOX). Esto sugiere que los mecanismos involucrados a nivel celular son complejos y sinérgicos²¹¹.

La introducción de grupos hidroxilo en las posiciones 6 y 7 del núcleo de la cumarina genera estructuras con capacidad de inhibir la xantina oxidasa, impidiendo la producción de ERO y dando lugar, pues, a un efecto antioxidante²¹⁰.

Al analizar la relación estructura-actividad (REA) de estos compuestos se ha visto que las posiciones más interesantes a la hora de dotar a las moléculas de actividad antioxidante *in vitro* son las posiciones 6, 7 y 8, en forma de 6,7-dihidroxycumarinas o 7,8-dihidroxycumarinas.

Adicionalmente se han estudiado diferentes híbridos que combinan en una misma molécula la estructura de cumarina y diferentes flavonas. Así, sobre estructuras híbridas chalcona-cumarina, la introducción de un grupo hidroxilo en la posición 6 de la cumarina ha dado lugar a moléculas con capacidad de neutralizar radicales libres y con un buen perfil citoprotector²¹².

Recientemente se ha evaluado una nueva serie de derivados híbridos chalcona-cumarina (**Figura 8**), con actividad antioxidante y agonista del receptor activado por proliferadores peroxisomales α/γ (PPAR α/γ); alguno de estos híbridos ha resultado ser incluso más potente que el fenofibrato utilizado como fármaco de referencia. Además, los resultados han demostrado que algunos de estos derivados chalcona-cumarina

presentan propiedades antioxidantes superiores al trolox. Al analizar su REA, se ha visto que la introducción de un grupo nitro en la posición 6 del núcleo de cumarina da lugar a compuestos con una mayor eficacia como agonistas de PPAR α y PPAR γ ²⁰⁹.

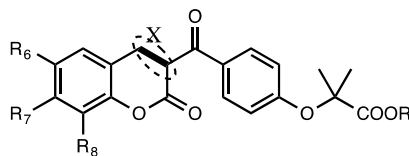


Figura 8. Estructura química de derivados híbridos chalcona-cumarina. X = doble o simple enlace

También se han llevado a cabo estudios sobre estructuras que presentan dos núcleos de cumarina fusionados (**Figura 9**). Estos derivados inhiben la oxidación del ADN causada por $\cdot\text{OH}$, $\text{Cu}^{2+}/\text{GSH}$ y cloruro de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH), incluso en ausencia de grupos hidroxilo²¹².

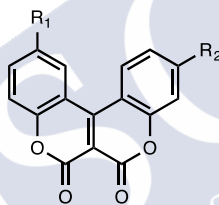


Figura 9. Estructura química de derivados con dos núcleos cumarina fusionados

La sustitución con un grupo hidroxilo y un grupo N,N-dimetilamino, localizados en diferentes anillos bencénicos, ha originado derivados con un efecto inhibidor de la oxidación del ADN inducida por AAPH tres veces mayor que aquellos que presentan un único grupo hidroxilo. Por lo tanto, la combinación de ambos grupos puede ser una estrategia novedosa en el diseño de cumarinas fusionadas para obtener nuevos fármacos con actividad antioxidante²¹³.

En los últimos años también se han evaluado como posibles agentes antioxidantes derivados pirazolocumarina (**Figura 10**) que han demostrado, además de una excelente actividad antifúngica y antimicrobiana contra diferentes cepas bacterianas, una potente actividad antioxidante llevando a cabo la neutralización $\cdot\text{OH}$ y del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH \cdot).

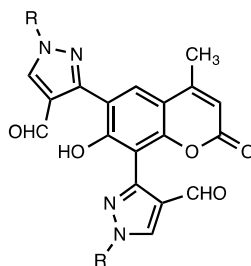


Figura 10. Estructura química de derivados de pirazolocumarina

El análisis detallado de la REA de estos derivados indica que la introducción de un anillo de pirazol da lugar a una actividad antioxidante superior a la que presentan los derivados con grupos carbazona o hidrazona^{205,214}.

2.4.2.2. Actividad antiinflamatoria

La inflamación es una respuesta del organismo esencial frente a cualquier agresión. Se cree que está presente en el inicio de diferentes enfermedades como la obesidad, el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas. Considerando que la cascada bioquímica del ácido araquidónico (AA) conduce a la formación de mediadores pro-inflamatorios como PG y leucotrienos (LT), bloquear esta vía es una forma de combatir la inflamación²¹⁵.

Numerosas cumarinas aisladas de plantas o de origen sintético poseen significativa actividad antiinflamatoria y analgésica. Los sustituyentes hidroxilo en posiciones 4 y 7 son responsables de la elevada actividad de las cumarinas como agentes antiinflamatorios no esteroideos. Existen además, amidocumarinas que presentan actividad combinada antioxidante-antiinflamatoria²¹⁶.

Entre los derivados de cumarina con actividad antiinflamatoria, cabe destacar los derivados de furanocumarina y de piranocumarina²¹⁵. Entre las furanocumarinas, destaca la imperatorina (**Figura 11**). Esta molécula se encuentra en *Angelica dahurica*, *Glihenia littoralis*, *Cnidium monnieri* y *Peucedanum praeruptorum* así como en otras especies de Apiaceae. Estas plantas se usan en la medicina tradicional china y coreana, generalmente como antipiréticos y analgésicos.

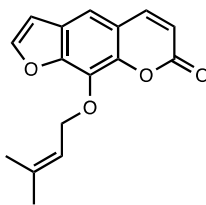


Figura 11. Estructura química de imperatorina

La mayoría de los estudios que investigan la actividad antiinflamatoria de la imperatorina fueron llevados a cabo en células RAW264.7 utilizando lipopolisacárido (LPS) como agente pro-inflamatorio²¹⁷ y sobre el edema plantar en ratón inducido por carragenina^{218,219}. En general, la inhibición de la óxido nítrico sintasa (NOS) y la COX-2 ha sido descrita como el mecanismo de acción de la actividad antiinflamatoria de este derivado de furanocumarina. La imperatorina también ha demostrado ser eficiente en rinitis alérgica²¹⁷, lesión pulmonar aguda inducida por LPS en ratón²²⁰ y además presenta un efecto antialérgico en asma alérgica mediada por células Th-2²²¹.

Un isómero de la imperatorina, la isoimperatorina, tiene actividad inhibitoria de COX y también muestra inhibición de la expresión inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF- α)²²², lo que explica sus propiedades antiinflamatorias. También han sido evaluadas como inhibidores de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) diversas furocumarinas extraídas de plantas de origen chino²²³.

Otra furocumarina destacable por su acción antiinflamatoria es la seselina (**Figura 12**), obtenida de *Sigmathantus trifolius*, que ha demostrado inhibir la hiperalgesia inflamatoria y también presenta efecto antinociceptivo²²⁴.

La calipterixina y un derivado de dihidroseselina obtenidas de *Seseli resinosum*, (**Figura 12**) se han asociado con inhibición de enzimas inflamatorias como iNOS y COX-2 y citocinas como TNF- α e IL-6 a través de las vías NF- κ B, MAPK y Akt²²⁵.

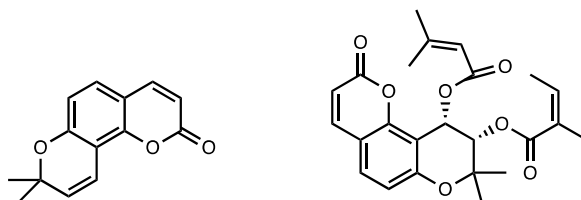


Figura 12. Estructura química de seselina (izqda.) y calipterixina (dcha)

La *Angelica decursiva* es una planta utilizada en la medicina tradicional coreana, a partir de la cual se han obtenido cumarinas, que inhiben también en células RAW 264.7, la producción de óxido nítrico (NO) y TNF- α , así como la expresión de la iNOS y la COX-2. Estos resultados sugieren que las cumarinas aisladas de *A. decursiva* podrían usarse como posibles cabezas de serie para el desarrollo de agentes terapéuticos para los trastornos asociados a la inflamación²²⁶.

Diversas sesquiterpenocumarinas extraídas de *Ferula szowitsiana* presentaron *in vitro* propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias, reduciendo la expresión de la iNOS y COX-2²²⁷.

Otras cumarinas como diferentes praeruptorinas (**Figura 13**), obtenidas de las raíces de *Peucedanum praeruptorum*, han demostrado reducir la producción de NO y la liberación de IL-1 β , IL-6 y TNF- α inducida por macrófagos estimulados por LPS^{228,229}. La corimbocumarina (**Figura 13**), aislada de *Seseli gummiferum subsp. corymbosum*, ejerce su efecto al suprimir la activación de NF- κ B e induce la expresión de hemooxigenasa 1 (HO-1)^{229,230}.

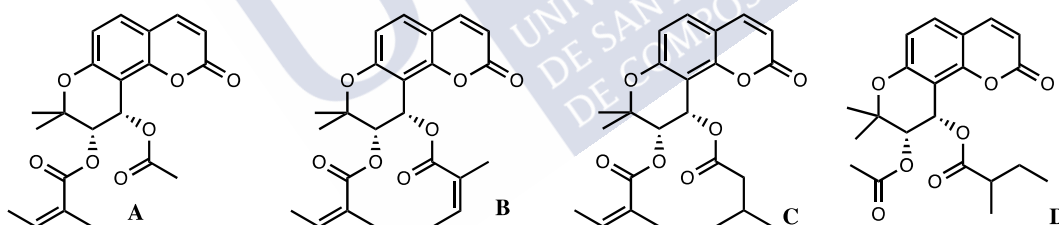


Figura 13. Estructuras químicas de praeruptorina A (A), praeruptorina B (B), praeruptorina E (C) y corimbocumarina (D)

El ostol (**Figura 14**), aislado de las semillas de *Cnidium monnieri*, puede inhibir la generación de ERO, la activación de NF- κ B y la expresión de la COX-2 en macrófagos activados por lipopolisacárido (LPS)²³⁰.

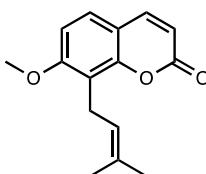


Figura 14. Estructura química del ostol

2.4.2.3. Inhibición enzimática

MAO

Además de la inhibición, previamente descrita, de enzimas implicadas en procesos de oxidación o inflamación, se han aislado y/o sintetizado numerosas cumarinas con actividad sobre otras enzimas implicadas en las enfermedades neurodegenerativas²³¹. Presentan actividad inhibidora de la MAO algunas cumarinas procedentes de Rutáceas, Malváceas o Monascáceas. Destacan las cumarinas procedentes de *Zanthoxylum schinifolium*, cumarina-lignanais aisladas de las raíces de *Hibiscus syriacus*²³², o derivados cumarínicos procedentes de *Monascus anka*²³³.

Las geiparvarinas (**Figura 15**), cumarinas sustituidas en la posición 7, que se extraen de las hojas de *Geijera parviflora*, presentan *in vitro* potente actividad inhibidora de la MAO con fuerte selectividad por la isoforma B. Si bien las modificaciones estructurales llevadas a cabo en el núcleo de la cumarina o la furanona de geiparvarina disminuyen la actividad inhibidora de la MAO, la eliminación del grupo metilo en el puente alquenoxi proporciona un derivado con mayor potencia inhibidora de la MAO-B y una gran selectividad por esta isoforma^{24,234}.

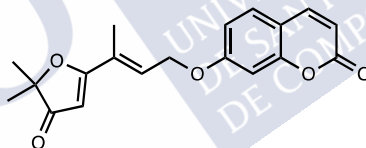


Figura 15. Estructura química de la geiparvarina

Adicionalmente, se han evaluado distintas series de derivados sintéticos de cumarina, observándose que la naturaleza y posición de los sustituyentes sobre el anillo de benzopirano condicionan su actividad sobre la MAO y su selectividad por una de las isoformas.

Como se ha indicado previamente, la MAO presenta dos isoformas. En ambas la presencia de aminoácidos hidrofóbicos en la entrada de la cavidad, donde se encuentra el centro activo de la enzima, favorece las interacciones hidrofóbicas. Los estudios de modelización molecular mostraron que el espaciador oximetileno de las 7-benciloxicumarinas se ajusta a la cavidad de entrada de la MAO-B, y puede establecer un enlace de hidrógeno entre el oxígeno y el residuo Tyr326 situado en la cavidad de

entrada de la enzima. A diferencia de la MAO-B, la cavidad de entrada de la MAO-A puede acomodar grupos más voluminosos y muestra una gran afinidad por el espaciador 7-sulfoniloxi, que actúa como un aceptor de enlaces de hidrógeno. Además, se ha descrito que las sustituciones en posiciones 3 ó 4 del esqueleto de cumarina con grupos metilo u otros grupos de pequeño tamaño incrementan la afinidad por la MAO-B de los derivados 7-benciloxicumarina, mientras los ésteres 7-sulfoniloxi presentan mayor selectividad hacia la MAO-A²⁴.

Otra de las posiciones ampliamente estudiada para la obtención de cumarinas con actividad inhibidora de la MAO es la posición 3. En las 3-fenilcumarinas y 3-heteroarilcumarinas, la presencia de sustituyentes en diferentes posiciones del núcleo cumarina modula la actividad y la selectividad por las isoformas A/B de la MAO. Se ha visto que la introducción de grupos hidroxilo en posición 4 en estos derivados, da lugar a una pérdida de la actividad inhibidora de la MAO-B. Los estudios de modelización molecular sugieren que los grupos hidroxilo en esta posición podrían ejercer un choque estérico con la Tyr326, lo que se corresponde con el análisis de su REA²³⁵. La sustitución con un grupo hidroxilo en la posición 4 de los derivados de 3-benzamidocumarina también reduce la actividad inhibidora de la MAO-B²³⁶⁻²⁴⁰.

Numerosos estudios para modular la afinidad, selectividad y propiedades farmacocinéticas de las cumarinas se centran en la posición 4 del anillo de cumarina. La 7-[(3-clorobenzil)oxi]-4[(metilamino)metil]cumarina (NW-1772) ha sido patentada por su capacidad de atravesar la BHE, su baja toxicidad y su potencia y actividad frente a la MAO-B. Un análogo abierto de esta molécula, la safinamida, como ya se ha mencionado previamente, ha sido aprobado para el tratamiento de la EP, administrada conjuntamente con LD para tratar la enfermedad en estadios avanzados²⁴.

ChEs

Se han descrito un gran número de derivados de cumarina con actividad anticolinesterásica.

Las cumarinas escopoletina y escopolina, aisladas del rizoma de *Scopolia carniolica* provocan *in vitro* e *in vivo* un incremento de la concentración de ACh, probablemente debido a la inhibición de la AChE (**Figura 16**)²⁴¹.

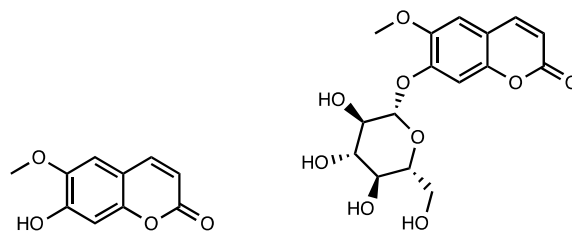


Figura 16. Estructura química de escopoletina (izqda) y escopolina (dcha)

Distintas cumarinas aisladas de *Peucedanum ostruthium* y *Ferula lutea* y 4-fenilcumarinas aisladas de *Mesua elegans* mostraron también actividad inhibitoria de la AChE. Las furocumarinas esfondina y pimpinellina (**Figura 17**), obtenidas de *Heracleum spp.* mostraron una potente actividad inhibitoria frente a AChE y BuChE²⁴².

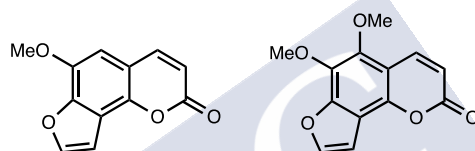


Figura 17. Estructura química de esfondina (izqda) y pimpinellina (dcha)

Los sustituyentes voluminosos en posición 7 del núcleo de la cumarina conducen a derivados con actividad inhibitoria de AChE. También las sales de amonio cuaternario con un núcleo cumarina resultaron inhibir la AChE y la BuChE, con mayor potencia sobre la AChE. El átomo de nitrógeno cuaternario podría incrementar la interacción de la cumarina en el sitio periférico de la enzima, aumentando así la actividad inhibitoria de la AChE^{243,244}.

Se han descrito también sales de N-bencilpiridinio (**Figura 18**) con un núcleo de cumarina que poseen mayor actividad sobre la AChE que sobre la BuChE y carboxamidocumarinas como inhibidores selectivos de la AChE^{245,246}.

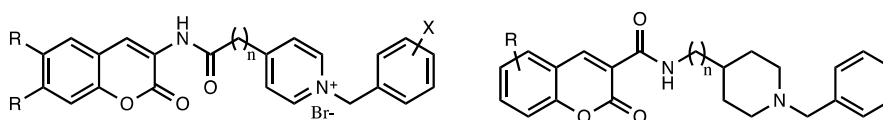


Figura 18. Estructura química de derivados de 3-(N-bencilpiridinioalquilamido)cumarina (izqda), 3-(N-bencilpiperidinalquilcarboxamido)cumarina (dcha)

Una estrategia muy actual en el diseño de inhibidores de ChE consiste en conjugar derivados de cumarina con fármacos conocidos como el donepezilo o la tacrina. Los

estudios de modelización molecular de estas nuevas moléculas sugieren que se unen tanto al sitio aniónico catalítico como al PAS, con preferencia de la cumarina por el sitio periférico. La planaridad de la cumarina y las posibles interacciones π - π con los residuos aromáticos de la enzima favorecen su acomodación, mientras que una carga positiva neta (sales de amonio) o un nitrógeno protonable permiten fuertes interacciones cation- π con el sitio catalítico.

BACE1

La BACE1 es una aspartil proteasa transmembrana relacionada con la familia de la pepsina. El dominio catalítico contiene dos residuos de proteasa aspártica característicos (Asp-Thr/Ser-Gly-Ser/Thr) que forman el sitio activo y están orientados hacia la luz del compartimento intracelular. Aunque se han encontrado numerosos peptidomiméticos con actividad inhibidora de BACE1 *in vitro*, estas moléculas no presentan un perfil farmacocinético adecuado; por ello se buscan nuevos inhibidores no peptídicos con un tamaño lo suficientemente elevado para unirse al sitio activo con alta afinidad, pero por otra parte, lo suficientemente pequeñas para tener un perfil farmacocinético favorable que les permita conseguir una adecuada penetración en el SNC²⁴⁷.

Los estudios llevados a cabo sobre distintas furanocumarinas naturales obtenidas de la planta medicinal *Angelica dahurica*, mostraron que cinco de ellas presentan actividad inhibidora de BACE1: isoimperatorina, imperatorina, (+)-oxipeucedanina, (+)-biacangelicol y (+)-biacangelicina. Sin embargo, esta actividad fue inferior a la del inhibidor de referencia, el peptidomimético sintético Lys-Thr-Glu-Glu-Ile-Ser-Glu-Val-Asn-(statine)-Val-Ala-Glu-Phe-OH²⁴⁸.

Analizando diferentes estructuras cumarínicas, se observó que si bien la cumarina simple carece de actividad inhibidora de BACE1, moléculas como isoimperatorina e imperatorina (**Figura 11**), ambas con un grupo preniloxi en la posición 5 ó 8 respectivamente, sí resultaron activas como inhibidores de BACE1. Al analizar estructuras como la bergamotina y el 8-geraniloxipsoraleno, ambas con grupos geraniloxi en lugar de preniloxi en las posiciones 5 ó 8, se observó que eran significativamente más activas que aquellas que presentaban grupos preniloxi. El aurapteno, una cumarina que presenta un grupo geraniloxi en la posición 7, también presenta una actividad inhibidora moderada sobre la BACE1 (**Figura 19**). La

introducción de un grupo metoxilo adicional en la posición 5 ó 8, puede tener una influencia significativa en la actividad inhibidora de BACE1. Según los resultados mencionados anteriormente, las sustituciones funcionales en el anillo de benceno aumentan o disminuyen selectivamente la inhibición de la actividad inhibidora de la BACE1, y un grupo geraniloxi parece ser relevante para esta actividad²⁴⁹.

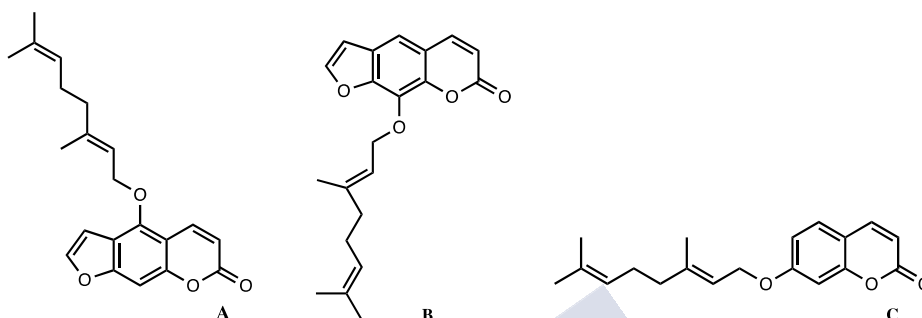


Figura 19. Estructura química de bergamotina (A), 8-geraniloxipsoraleno (B) y aurapteno (C)

Así mismo, y tras la realización de diversos estudios, se ha observado la afinidad por la BACE1 de los derivados fenilpiperazínicos de cumarinas (**Figura 20**), actuando estos como inhibidores²⁵⁰.

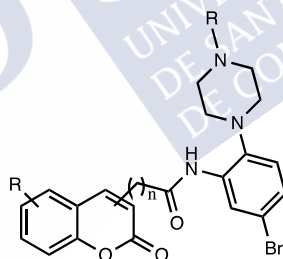


Figura 20. Estructura química de derivados de piperazinfenilcarboxamidocumarina

COX

Tanto cumarinas naturales, extraídas generalmente de plantas, como cumarinas sintéticas han demostrado interesantes propiedades como inhibidoras de COX o ser capaces de regular los niveles de expresión de esta enzima.

La COX presenta dos isoformas, la COX-1 y la COX-2. Ambas poseen en su estructura dos dominios: uno de unión a la membrana, constituido por 4 hélices que forman un canal, y otro que posee la actividad enzimática. En esta región hay dos lugares activos, uno que cataliza la ciclooxygenación y otro la peroxidación. Ambas

isoformas son las responsables de la conversión del AA en PGs y tromboxanos (Tx). Aunque ambas COX tienen una afinidad similar por el AA y presentan una homología en su estructura de un 90%, su afinidad por los sustratos es ligeramente diferente, al igual que su presencia en el organismo. La COX-2 presenta un canal más amplio que permite el acceso de moléculas de mayor tamaño que no penetrarían en la COX-1^{251,252}.

La 7-N-acetilamino-4-metilcumarina, una cumarina sintética, se reveló como un agente antiagregante plaquetario prometedor, tanto *in vitro* como *in vivo*, a través de la inhibición de la COX-1, lo que resulta en la regulación descendente del TxA2, la modulación del factor tisular y la inhibición de la agregación plaquetaria²⁵³.

Diversos derivados de cumarina con una base de Schiff en posición 7 se evaluaron como posibles agentes antiinflamatorios y antioxidantes tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. El compuesto (E)-4-metilcumarina-7-formadoxima logra una potente inhibición de COX-1 y además reduce el edema inducido por *Saccharomyces cerevisiae* en la aponeurosis plantar en ratón²⁵⁴. Se describieron además varias cumarinas con bases de Mannich que, sin embargo, mostraron una mejor actividad inhibidora de la lipoxigenasa (LOX) que de la COX-1²⁵⁵.

La furanocumarina bergapteno (**Figura 21**), aislada de *Euodia daniellii* demostró actividad inhibidora de COX-2²⁵⁶.

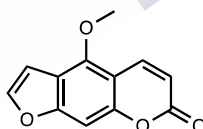


Figura 21. Estructura química del bergapteno

La evaluación de los efectos antiinflamatorios de la nodakenina (**Figura 22**), una cumarina aislada de las raíces de *Angelica gigas*, evidenció su capacidad inhibidora de la COX-2 en estudios *in vitro*. Los resultados indicaron que la nodakenina inhibe, de manera dependiente de la concentración, tanto la COX-2 como la iNOS. Además, se descubrió que inhibe la producción y la expresión del ARNm de TNF- α , IL-6 e IL-1 inducidas por LPS²⁵⁷.

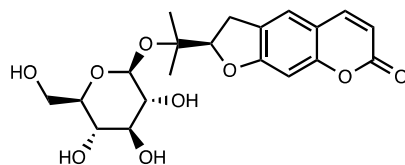


Figura 22. Estructura química de la nodakenina

Las cumarinas tricíclicas sulfonatadas (**Figura 23**) demostraron ser capaces de inhibir la producción de NO y prostaglandina E2 (PGE2) inducida por LPS en macrófagos RAW264.7, tienen actividad inhibidora de COX-2 y, además, capacidad de reducir la expresión de COX-2 e iNOS²⁵⁸.

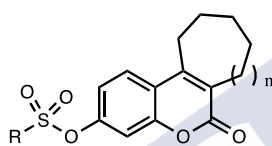


Figura 23. Estructura química de cumarina tricíclica sulfonatada

Algunas moléculas derivadas de 3-metil-1-fenilcromeno[4,3-c]pirazol-4(1*H*)-ona presentaron actividad inhibidora, potente y selectiva, de la COX-2. En algunos casos, incluso se observó un mayor efecto antiinflamatorio sobre el edema plantar de rata inducido por carragenina que el mostrado por celecoxib, fármaco de referencia. Los estudios de REA sugieren que el anillo de N-fenilo sustituido en posición *para* con trifluorometil conduce a una inhibición más selectiva de la COX-2²⁵⁹.

En estudios recientes, ciertos derivados sintéticos de dihidropiranocumarina han demostrado inhibir selectivamente la COX-2, destacando el ciclocumarol (**Figura 24**), que inhibió la síntesis de PGE2 de forma similar al compuesto de referencia utilizado (NS-398). Sin embargo, al analizar la REA, se observó claramente que los grupos electroattractores sobre el fenilo, como trifluorometil y nitro, disminuyen la actividad inhibidora de COX-2²⁶⁰.

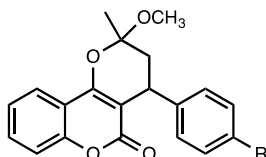


Figura 24. Estructura química de derivados de dihidropiranocumarina (ciclocumarol)

La selectividad hacia la COX-2 mostrada por el ciclocumarol puede ser debida a los enlaces de hidrógeno entre el oxígeno del grupo metoxilo y los residuos His90 y Arg513 del sitio activo de la enzima.

5-LOX

La ruta de las LOX es la otra ruta principal en la cascada del AA, a través de la cual se sintetizan los ácidos hidroxi-eicosatetraenoicos (HETEs) o los LTs²⁶¹. En humanos se presentan seis isoformas funcionales de LOX. La 5-LOX, enzima pro-inflamatoria, participa conjuntamente con las COX en procesos de inflamación²⁶².

Recientes estudios han evaluado diferentes benzotiazolcumarinas (**Figura 25**) como potenciales agentes antiinflamatorios y analgésicos por su inhibición *in vitro* de la enzima LOX. Atendiendo a los resultados obtenidos, se puede observar que aquellos que presentan un grupo cloro o metoxilo en la posición 6 del sustituyente benzotiazol muestran una mayor potencia inhibidora²⁶³.

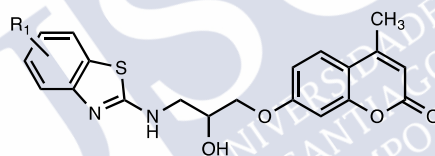


Figura 25. Estructura química de derivados de benzotiazolcumarina

Inhibidores enzimáticos multidiana

La forma más simple, pero también más directa, de diseñar y sintetizar ligandos multidiana consiste en la unión de dos farmacóforos, responsables de dos actividades farmacológicas diferentes, por medio de un espaciador estable o metabólicamente escindible (conjugación), o por la formación de un enlace covalente directo (fusión). Un problema derivado de la unión de dos o más farmacóforos en pos de una única estructura que presente diferentes actividades farmacológicas, es que, generalmente, se obtienen estructuras muy grandes con alto peso molecular, alto número de enlaces rotativos, alta lipofilia y baja solubilidad acuosa. En consecuencia, estas moléculas pueden mostrar pobres propiedades farmacocinéticas y baja biodisponibilidad. Otra forma de diseñar moléculas multidiana es la que se lleva a cabo en los procesos de hibridación, en los que dos o más farmacóforos se fusionan para dar lugar a una única molécula capaz de poseer las actividades de los farmacóforos originales²⁴.

Debido a las interacciones bien conocidas del núcleo de cumarina dentro de los sitios de unión de la MAO-B y ChEs, los conjugados moleculares que contienen este *scaffold* se han descrito ampliamente en la literatura como inhibidores duales de ChE-MAO-B²⁴.

Se han descrito derivados de 3-amidocumarina con actividad inhibidora de MAO-B y AChE, que han demostrado además propiedades neuroprotectoras frente a H₂O₂ en neuronas corticales de rata, así como actividad secuestradora del radical DPPH•²⁶⁴.

Algunos derivados de 7-benciloxicumarina descritos previamente como inhibidores de la MAO-B, mostraron además una inhibición no competitiva de la AChE en el rango de concentración micromolar²⁶⁵. Posteriormente se desarrollaron nuevos derivados mediante la introducción de un grupo bencilamina (protonable a pH fisiológico) sobre el sustituyente benciloxi obteniéndose inhibidores duales de AChE-MAO-B, con actividad en el rango nanomolar sobre la MAO-B y submicromolar sobre la AChE. Además, la introducción de un sustituyente hidroximetilo en la posición 4 de estos derivados de cumarina, condujo a inhibidores duales con una mejor solubilidad acuosa sin afectar a la potencia o selectividad sobre la MAO-B²⁶⁶.

Se ha observado también que ciertas cumarinas, naturales y sintéticas, son capaces de inhibir la AChE y la BuChE. Una fenilcumarina (3-(4-(benzilamino)metil)fenil-6,7-dimetoxicumarina (**AP2238**) (**Figura 26**)) ha sido descrita como el primer compuesto con una actividad dual, inhibidora de la AChE y la BACE1 a concretaciones nanomolares. Fue considerada una molécula prometedora para el tratamiento de la EA^{264,267,268}.

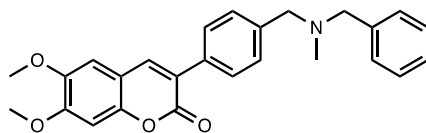


Figura 26. Estructura química de **AP2238**

Al analizar una serie de derivados en los cuales el sustituyente 7-benciloxi fue intercambiado por una N-bencilpiperidina, el resto farmacofórico del donepezilo (**Figura 27**), se observa que la sustitución en posición 3 conduce, en general, a derivados más activos que los regioisómeros sustituidos en posición 4.

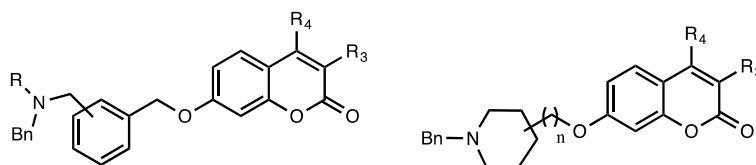


Figura 27. Estructura química de derivados 7-benciloxicumarina (izqda) y 7-(N-bencilpiperidin)alquilocumarina (dcha)

La introducción de un segundo nitrógeno básico en el espaciador²⁶⁹, así como la sustitución del resto benciloxi por un grupo N-bencilpiperidinio cargado²⁷⁰ dio lugar a estructuras multidiana, pero de baja potencia. La afinidad de estas estructuras por la MAO-B se vio negativamente afectada al introducir residuos cargados.

Está descrita una serie de derivados tacrina-cumarina (**Figura 28**), con actividad no solo como inhibidores de AChE y BuChE, sino también como quelantes metálicos de Cu²⁺ y con capacidad para inhibir la agregación inducida de Aβ₄₂²⁷¹. Los dos restos se conjugaron a través de un espaciador, que presentaba un anillo de piperazina unido por un enlace amino a la tacrina²⁷².

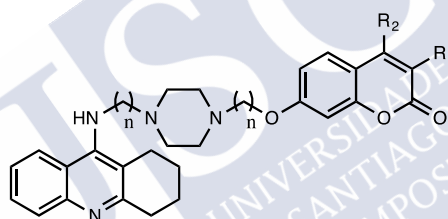


Figura 28. Estructura química de derivados tacrina-cumarina

De manera similar, los conjugados 3-carboxamidocumarina-tacrina (**Figura 29**) mostraron una inhibición potente, pero no selectiva, de la AChE y BuChE inhibiendo además la BACE1 y la agregación de Aβ²⁷³.

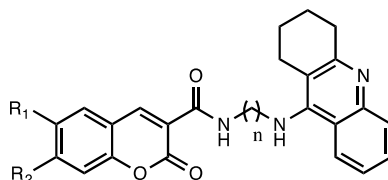


Figura 29. Estructura química de derivados conjugados de 3-carboxamidocumarina-tacrina

Se ha comprobado también que la introducción de sustituyentes voluminosos en derivados de 8-(aminometil)-7-hidroxycumarina, no solo dota a estas moléculas de actividad inhibidora de BACE1, sino que también les confiere una buena actividad inhibidora sobre AChE y BuChE. Además, estos derivados inhiben la autoagregación de

A β ₄₀ e interfieren en la agregación de A β inducida por la AChE mediante la unión al sitio activo periférico de la enzima²⁷⁴.

La evaluación de cumarinas procedentes de especies endémicas en Corea como *Dystaenia takeshimana* (Nakai), evidenció que estas mostraban actividad inhibitoria dual de la COX-2 y la 5-LOX. Las cumarinas escopoletina (**Figura 16**) y (+)-marmesina (**Figura 30**) presentan esta misma actividad dual²⁷⁵.

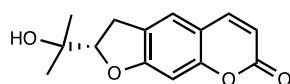


Figura 30. Estructura química de la (+)-marmesina

También evidenciaron actividad inhibitoria sobre COX-1 y 5-LOX diversas furanocumarinas extraídas de los géneros *Angelica* y *Heracleums*²²².

La evaluación *in vitro* de una serie de nuevos conjugados pirazol-cumarina (**Figura 31**) como potenciales inhibidores duales de COX-2 y 5-LOX evidenció una potente actividad inhibitoria de ambas enzimas para todos ellos, pero pobre actividad sobre la COX-1. La sustitución con tres grupos metoxilo sobre el fenilo dio lugar al derivado más potente de la serie, que presenta *in vitro* mayor actividad frente a la COX-2 que el inhibidor de referencia (celecoxib). Atendiendo a la REA, se puede señalar que la presencia de grupos electroatrayentes en posición *para* del fenilo conduce a mejores resultados de inhibición de la COX-2 que la sustitución con grupos donadores de electrones²⁷⁶.

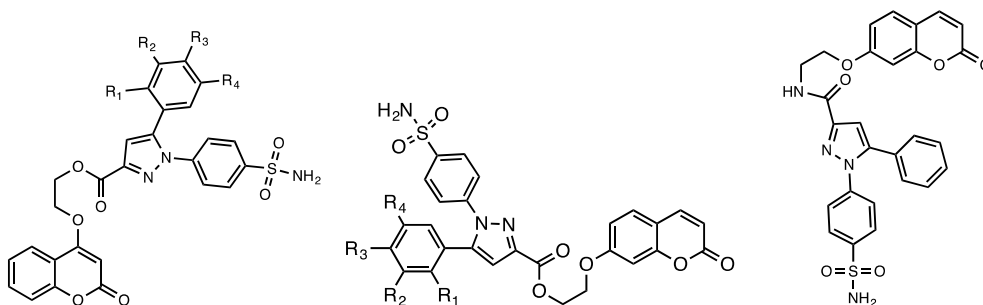


Figura 31. Estructuras químicas de diferentes conjugados pirazol-cumarina

Las cumarinas también pueden actuar como inhibidores de cinasas²⁷⁷, inhibidores de sulfatasas²⁷⁸, inhibidores de la 17- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 3 (17 β HSD3)²⁷⁹

e inhibidores de la aromatas²⁸⁰. Además, algunas cumarinas constituyen buenos sustratos y/o son inhibidores de enzimas metabólicas del citocromo P450. El 8-metoxipsoraleno, que se encuentra en las semillas de *Ammi majus*, muestra *in vitro* un potente efecto basado en la inhibición microsomal del citocromo P450^{186,281}.

2.4.2.4. Actividad cardiovascular

El valor potencial de flavonoides y cumarinas en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular se reconoció a partir de la correlación entre el consumo de fuentes dietéticas ricas en estos compuestos y el riesgo más reducido de desarrollar este tipo de enfermedades²⁸². Además, varios ensayos clínicos han mostrado los beneficios de una dieta rica en flavonoides y cumarinas sobre las enfermedades cardiovasculares²⁸³, síndrome post trombótico, aterosclerosis y salud vascular. Algunas de estas patologías han sido descritas como factores de riesgo de enfermedades neurodegenerativas como la EA^{284,285}.

En busca de nuevos fármacos con capacidad antihipertensiva se han evaluado diferentes extractos de *Mammea africana*. Los extractos de metanol y diclorometano de la corteza del tallo, contienen derivados de cumarina que presentan interesantes propiedades antihipertensivas en ratas hipertensas²⁸⁶. Además, también se evaluó la capacidad del extracto de diclorometano/metanol para producir hipoglucemia en ratas diabéticas²⁸⁷. Estos extractos podrían ser muy interesantes para pacientes con ambas patologías. Algunos derivados sintéticos de cumarina han demostrado propiedades cardiovasculares, en muchos casos como vasodilatadores selectivos, entre ellos, los análogos resveratrol-cumarina presentan efecto vasorrelajante sobre anillos aórticos de rata precontractados con noradrenalina²⁸⁸.

El carbocromeno (**Figura 32**) es un vasodilatador coronario específico y potente que se ha utilizado durante muchos años en el tratamiento de la angina de pecho²⁸⁹.

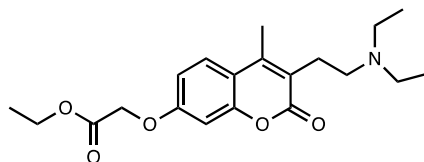


Figura 32. Estructura química de carbocromeno

Se evaluó también el efecto del ostol en la dieta (**Figura 14**), comprobando sus efectos beneficiosos tanto en la prevención de la aterosclerosis como en la supresión de los lípidos hepáticos. Los estudios realizados administrando ostol durante 4 semanas a ratas espontáneamente hipertensas, han evidenciado las actividades beneficiosas del ostol. No solo reduce la presión sistólica, sino que también es capaz de disminuir el contenido de colesterol y triglicéridos en el hígado, sin modificar su perfil en suero. El ostol logra aumentar la expresión del ARNm de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa, que conduce a una disminución del colesterol hepático mediante la inhibición de la actividad enzimática. También se ha observado que el ostol induce un aumento significativo en la expresión del ARNm de acil-CoA oxidasa, asociada con un aumento en la expresión de ARNm de carnitina palmitoil transferasa, lo que sugiere la aceleración de la oxidación de los ácidos grasos hepáticos²⁹⁰.

2.4.2.5. Actividad antiadipogénica

El tejido adiposo se conoce tradicionalmente como una fuente pasiva de las reservas de energía y la generación de calor corporal. Sin embargo, una cantidad excesiva de tejido adiposo, específicamente en el sobrepeso y la obesidad, representa uno de los factores de riesgo del síndrome metabólico, asociado con un gran número de enfermedades inflamatorias²⁹¹.

La esculetina, la fraxetina, la fraxidina, la fraxina (**Figura 33**) y otros muchos derivados de cumarina, aislados de la corteza de *Fraxinus rhynchophylla*, han sido evaluados como posibles fármacos antiadipogénicos. Esta corteza, cuyo principal ingrediente activo es la esculetina, es utilizada en la medicina tradicional china con la denominación de *Cortex Fraxini* en problemas hepáticos leves y de la vesícula biliar, así como suplemento dietético²⁹¹.

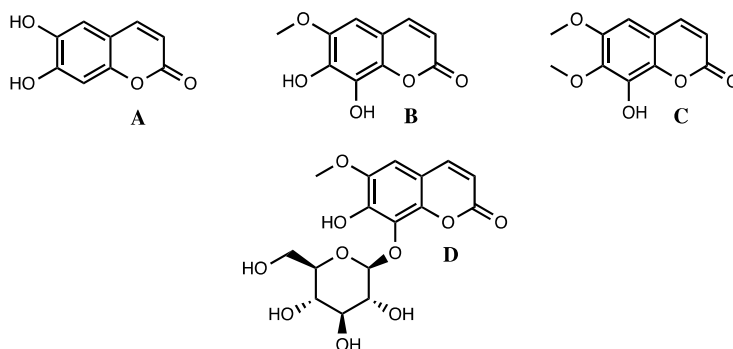


Figura 33. Estructura química de esculetina (A), fraxetina (B), fraxidina (C) y fraxina (D)

En los últimos años, se han evaluado nuevos derivados de esculetina que muestran una potente acción antiadipogénica en las células preadipocíticas de la línea 3T3-L1²⁹². Otro estudio ha demostrado que tiene efectos antiadipogénicos a través de la modulación de PPAR- γ y la proteína potenciadora de la unión a CAAAT (C/EBP α) a través de la vía de señalización la proteína cinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK)²⁹³.

2.4.2.6. Actividad en el SNC

El paso a través de BHE supone una gran limitación a tener en cuenta en la búsqueda de nuevas estructuras capaces de ejercer un efecto beneficioso en el SNC. Esta estructura encargada de proteger al SNC de sustancias potencialmente dañinas en muchos casos dificulta el acceso de los fármacos, impidiendo que estos lleguen a su diana. La evaluación de distintos derivados cumarínicos con acción protectora frente a la lesión cerebral isquémica en ratas, permitió descubrir que algunas moléculas con esta estructura presentan capacidad para atravesar la BHE²⁹⁴.

La fraxetina (**Figura 33**), con acción antioxidante y antiinflamatoria, ha sido evaluada frente a la apoptosis inducida por rotenona en células SH-SY5Y para conocer sus potenciales efectos neuroprotectores en la EP. Se ha comprobado que esta cumarina no solo es capaz de reducir las ERO inducidas por rotenona, sino que también atenúa tanto la actividad de la caspasa 3 (Casp3) como la de la poli ADP-ribosa polimerasa, reduciendo así la apoptosis²⁹⁵. Además, una serie de observaciones recientes sugieren que la inducción de la HO-1 inhibe la inflamación y la oncogenia, induce la fosforilación de Akt y AMPK y disminuye la expresión de la fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa (PTEN) un regulador negativo de Akt²⁹³.

Se estudiaron los efectos anticonvulsivos y neurotóxicos de la imperatorina (**Figura 11**) y el ostol (**Figura 14**) comparándolos con valproato sódico, un fármaco antiepiléptico clásico. Al analizar los resultados en la prueba de convulsiones por electrochoque en ratones, se vio que ambos derivados de cumarina poseen algunas propiedades potencialmente favorables en términos de supresión de las convulsiones, bastante similares a las reportadas para el valproato sódico²⁹⁶.

Se ha llevado a cabo la evaluación preclínica de una serie de derivados de 3-fenil-6-piranocumarina (**Figura 34**) para determinar su efecto antidepresivo en ratones albinos suizos. Los nuevos derivados mostraron un perfil de actividad significativo en la prueba de natación forzada (FST), reduciendo el tiempo de inmovilidad en más del 15% al compararlos con el medicamento estándar, la fluoxetina. Curiosamente, estos compuestos activos no causaron ninguna alteración significativa de la actividad locomotora, lo que indica que no producen ningún efecto de deterioro motor, poniendo de manifiesto que pueden tener un potencial valor terapéutico para el tratamiento de la depresión²⁹⁷.

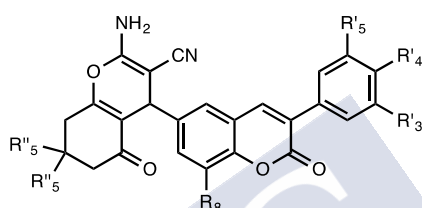


Figura 34. Estructura química de derivados aminopiranocumarina

El derivado cumarínico esculetina mostró efectos neuroprotectores en situaciones de isquemia/reperfusión cerebral²⁹⁸. También se ha visto que reduce, en el suero y el hipocampo, la inducción de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 β y TNF- α inducida por LPS. Además, atenúa la expresión de la iNOS y la COX-2 en el hipocampo mediante la inhibición de la vía del NF- κ B. Adicionalmente, ejerce neuroprotección que se ha atribuido a la regulación positiva del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y la expresión de la proteína fosforilada tirosincinasa B (p-TrkB) en el hipocampo²⁹⁹.

Recientes resultados sobre la administración dietética de umbeliferona y esculetina en ratones C57BL/6J mostraron que estas moléculas atenúan significativamente la neurotoxicidad inducida por la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), un compuesto que causa neurotoxicidad dopaminérgica nigroestriatal en la sustancia negra *pars compacta* pero no en el cuerpo estriado. Ambas cumarinas evitan el estrés nitrosativo, mantienen los niveles de GSH en ratones expuestos a MPTP y en cultivos celulares expuestos a 1-metil-4-fenilpiridinio e impiden la activación de la Casp3 dependiente de MPTP, un indicador de apoptosis. Dado que ambos compuestos son capaces de cruzar la BHE, tienen potencial para su uso en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas como la EP o la EA³⁰⁰.

El ostol podría ser un potencial agente terapéutico para el tratamiento de la esclerosis múltiple. En ratones, retrasa el progreso de la enfermedad cuando la terapia se inicia en el periodo subclínico y atenúa la severidad de la misma cuando se inicia tanto en periodo subclínico como clínico, disminuyendo la inflamación y la desmielinización. Además, se comprobó que bloquea la reducción del factor de crecimiento nervioso (NGF) y suprime el aumento de interferón gamma (IFN- γ). Estudios más recientes han demostrado que el ostol es capaz de promover la proliferación y mejorar la restauración neuronal en casos de lesión cerebral mecánica (MBI). Utilizando la prueba del laberinto de agua de Morris (MWM), se aprecia que mejora significativamente las funciones de aprendizaje y memoria en los ratones MBI, aumentando también el número de neuronas en las regiones de la lesión cerebral. El ostol es también capaz de regular al alza la expresión de los genes de auto-renovación Notch 1 y Hes 1. Sin embargo, cuando la actividad de Notch 1 es bloqueada por DAPT, un inhibidor de la γ -secretasa, la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de Notch 1 y Hes 1 es regulada a la baja, aboliéndose su efecto inductor de la proliferación, lo que sugiere que este está mediado, al menos en parte, por la activación de la vía de señalización de Notch 1³⁰¹.

El soulatrolido (**Figura 35**), cumarina natural sintetizada por las hojas de los árboles tropicales del género *Calophyllum*, es un potente inhibidor de la transcriptasa inversa del virus de inmunodeficiencia humana 1 (RT-HIV1), presenta efectos antinociceptivos, leve actividad antiinflamatoria, propiedades sedantes y actividad ansiolítica débil y, además, es activo frente a *Mycobacterium tuberculosis*³⁰².

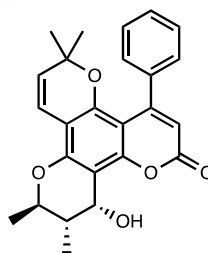


Figura 35. Estructura química de soulatrolido

2.5. RESVERATROL

2.5.1. Origen

El resveratrol (3,4',5-trihidroxi-estilbeno (RESV)) es un polifenol natural que se encuentra en diferentes plantas^{304,305} que fue identificado en 1939 por Michio Takaoka como constituyente de las raíces del eléboro blanco³⁰³ (*Veratrum album* var. *grandiflorum*). Ha sido identificado en 72 especies de plantas diferentes³⁰⁶, distribuidas en 12 familias y 31 géneros, entre los que se puede destacar: *Vaccinium* (Ericaceae), *Picea* (Pinaceae), *Eucalyptus* (Myrtaceae), *Veratrum* (Melanthiaceae), *Triflorum* (Rosaceae), etc; pero donde se encuentra la fuente más importante de resveratrol es en las semillas y raíces de la especie *Vitis vinifera*³⁰⁷, aunque la mayor concentración de resveratrol se va a encontrar en la piel de las uvas³⁰⁸.

En 1977, el RESV fue detectado en uvas de vino por Langcake y Pryce y se estableció que desde el punto de vista botánico, el resveratrol actúa como una fitoalexina³⁰⁹, es decir, una molécula de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana, producida por la planta en respuesta a un ataque fúngico (*Botrytis cinerea*), bajo condiciones de estrés, debido a lesiones o por exposición a la radiación ultravioleta (UV). El resveratrol también ha sido identificado en otros componentes de la dieta humana como son las moras, tanto negras como rojas (*Morus rubra* y *Morus nigra*) y en los cacahuetes (*Arachis hipogea*)³⁰⁵.

Esta molécula se puede encontrar en dos formas isoméricas: *cis* o *trans* (**Figura 36**). El isómero *trans* es la isoforma más estable y la más abundante en el vino tinto³¹⁰.

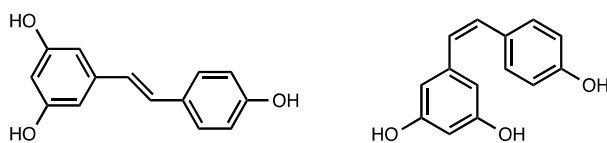


Figura 36. Estructura química del *t*-RESV (izqda.) y del *c*-RESV (dcha.)

La mayoría de los estudios científicos comparativos entre los efectos biológicos de *c*-RESV versus *t*-RESV generalmente han demostrado diferencias cuantitativas, no cualitativas, en las actividades de las dos isoformas, lo que sugiere que la conformación espacial diferente no parece modificar notablemente su interacción con las potenciales dianas celulares³⁰⁷.

2.5.2. Actividad farmacológica

El interés por las propiedades farmacológicas del RESV comenzó con el vino^{308,310} y la llamada *paradoja francesa*. Esta se refiere a la baja tasa de enfermedad cardiovascular en Francia cuando se agrega a la dieta un consumo moderado de vino tinto, a pesar de que esta es rica en grasas saturadas. Tras estos hallazgos, se atribuyeron al vino y la uva varias propiedades farmacológicas, incluida una disminución de la peroxidación lipídica y la agregación plaquetaria. Desde entonces y debido al interés despertado por el RESV se han llevado a cabo numerosos estudios epidemiológicos, que parecen confirmar la existencia de la relación entre el consumo moderado de vino y los beneficios cardiovasculares³¹¹.

En 1992, Siemann y Creasy establecieron por primera vez la presencia de este polifenol en el vino. En líneas generales, el RESV está presente en concentraciones más elevadas en los vinos tintos que en los vinos blancos. Esta situación puede deberse a las diferencias que existen en el proceso de fabricación de ambos tipos de vino, ya que en la fabricación de vinos tintos la uva se mantiene en todo momento en presencia del hollejo³¹².

Actualmente, las propiedades farmacológicas atribuidas al RESV se han incrementado. Se le atribuyen no solo propiedades como inhibidor de enzimas relacionadas con el metabolismo del AA, sino también efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antiamiloidogénicos³¹³ ya que tiene un papel activo frente a diferentes rutas relacionadas con la inflamación, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la angiogénesis o la apoptosis, entre otras. Por lo tanto, ha despertado un particular interés en enfermedades neurodegenerativas como la EP y la EA.

Aunque los estudios *in vitro* muestran una alta eficacia en las células, se sabe que su distribución a los tejidos es muy baja. A pesar de que presenta una buena absorción, el problema de la biodisponibilidad está determinado mayoritariamente por su rápida eliminación y un fuerte efecto de primer paso hepático. En consecuencia, los estudios *in vitro* deben interpretarse con precaución cuando se intenta extrapolar su efecto a estudios *in vivo*. Sin embargo, a pesar de su baja biodisponibilidad, el RESV muestra eficacia *in vivo* y se sabe que puede incluso unirse a proteínas plasmáticas que podrían servir como reservorio. Otra explicación podría radicar en la recirculación

enterohepática de los metabolitos del RESV, seguida de su desconjugación en el intestino delgado y su reabsorción o incluso, sus efectos *in vivo* podrían estar relacionados con la actividad de sus metabolitos. Se desconoce la dosis óptima de RESV. Debido a su baja biodisponibilidad, en algunos ensayos clínicos se han utilizado dosis altas que parecen no ser necesarias, pues se ha demostrado que, por ejemplo, la dosis baja tiene una eficacia quimiopreventiva del cáncer incluso superior a la dosis alta³¹⁴.

Se están desarrollando diferentes formas de administración para mejorar la biodisponibilidad y la solubilidad del RESV. Algunos ejemplos son la encapsulación en formulaciones liposomales, complejos de resveratrol-proteína, nanopartículas de lípidos sólidos, microesferas de quitosano o derivados de polietilenglicol³¹⁴.

2.5.2.1. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante del RESV puede explicarse debido a la supresión de ERO por dos métodos diferentes. Por un lado, por la inducción de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GPX), la catalasa y la SOD. Por otro lado, la inhibición de genes pro-oxidantes que codifican la mieloperoxidasa y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). El *t*-RESV reduce los niveles de iNOS y aumenta la producción de la HO-1 para disminuir el daño oxidativo en las células³¹⁵.

Tiene la capacidad de secuestrar radicales libres reduciendo así la peroxidación de los lípidos de membrana en las células neuronales. Debido a que protege las membranas, posiblemente consiga reducir los efectos del estrés oxidativo en las células. En asociación con vitamina E o C, la acción antioxidante se ve reforzada (presentan un efecto sinérgico). Probablemente también reduzca la muerte celular^{316,317}.

Varias líneas de investigación han demostrado que el tratamiento con *t*-RESV mejora las capacidades respiratorias mitocondriales. De hecho, el *t*-RESV activa la vía SIRT1-AMPK y luego induce la actividad PGC-1 α . La activación de PGC-1 α conduce a biogénesis mitocondrial y mejora de su función³¹⁸.

La disfunción mitocondrial juega un papel importante en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas. En estudios en modelos experimentales de la EP se

ha demostrado que el efecto antioxidante del *t*-RESV protege a las neuronas dopaminérgicas³¹⁹.

2.5.2.2. Actividad antiinflamatoria

El RESV es eficaz para reducir el estado inflamatorio en modelos de neuroinflamación *in vitro* e *in vivo*. Se ha descrito que es capaz de reducir la producción de citocinas pro-inflamatorias además de inhibir la respuesta inflamatoria inducida por LPS tanto *in vitro* como *in vivo*. El RESV puede reducir la liberación de mediadores inflamatorios como IL-1 β , IL-6 y TNF α a través de la inhibición de las vías de señalización en cascada celular que involucran NF- κ β y factor de transcripción activador de la proteína 1 (AP-1)^{320,321}.

Se ha descrito que en células de la glía el RESV actúa a diferentes niveles: ejerce neuroprotección frente a la neurotoxicidad producida por el LPS, inhibe la activación de la microglía y la expresión de factores pro-inflamatorios inducidos por LPS. Esta inhibición de la neuroinflamación mediada por la microglía puede ser una nueva y prometedora aproximación en la terapéutica de las enfermedades neurodegenerativas³²².

Varios estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que la activación de microglía y astrocitos provoca una acumulación de A β que induce a la secreción de agentes proinflamatorios como citocinas (IL-6, IL-1 β , TNF- α) y radicales libres. A su vez, las citocinas pro-inflamatorias inducen la agregación de A β que causa también la producción de ERO y TNF- α ³²². El RESV disminuye la producción de mediadores pro-inflamatorios y la agregación de A β , alivia el estrés oxidativo y la muerte neuronal^{322,323}.

Además inhibe la formación de otros tipos celulares como mastocitos, neutrófilos y monocitos/macrófagos; de esta forma actúa sobre todas las fases fisiopatológicas de la respuesta inflamatoria. También inhibe sistemas enzimáticos como la COX y la LOX involucrados en la síntesis de mediadores pro-inflamatorios³²⁴.

2.5.2.3. *Actividad potenciadora de sirtuinas*

Las sirtuinas regulan diversos procesos celulares, incluida la reparación del ADN, la diferenciación de las grasas, la producción de glucosa, la sensibilidad a la insulina, la oxidación de ácidos grasos, la neurogénesis, la inflamación y el envejecimiento³²⁵⁻³²⁷.

En mamíferos se han identificado siete homólogos de sirtuina 2 (Sir2): SIRT1-7. Entre las SIRT, la SIRT1 se localiza básicamente en el núcleo de la célula aunque también tiene algunas funciones citoplasmáticas importantes. La SIRT1 desacetila las histonas y, por lo tanto, parece jugar un papel importante en la regulación del silenciamiento de la cromatina y la integridad del genoma, así como en la senescencia de los organismos^{325,326}. Además, desacetila muchos factores de transcripción clave y cofactores implicados en las enfermedades relacionadas con la edad como p53, las proteínas FoxO, PPAR- γ , el coactivador-1 (PGC-1) y NF- κ B^{327,328}.

La sobreexpresión de la SIRT1 puede actuar en el SNC inhibiendo procesos neuroinflamatorios y prooxidantes mediante múltiples mecanismos³²⁹. Los mecanismos implicados incluyen la estimulación de la regulación por la vía microRNA-CREB-BDNF, la inhibición de las vías de señalización dependientes de mTOR y AMPK, la inhibición de enzimas, la transcripción de NF- κ B y vías apoptóticas, y la estimulación de la autofagia celular y la expresión de Nrf2, HO-1, NQO1, entre otros^{328,329}.

El RESV induce la sobreexpresión de SIRT1 y la consiguiente neuroprotección y contribuye a mejorar el aprendizaje y la memoria. Suprime eficazmente las actividades apoptóticas de p53 y FoxO a través de la sobreexpresión de SIRT1 y confiere protección neuronal en la EA. Es capaz de activar la transcripción del gen que codifica la α -secretasa. Tras la inyección intracerebroventricular de RESV en un modelo animal, se observó una reducción significativa en la neurodegeneración del hipocampo, que se ha asociado con una disminución en la acetilación de SIRT1³³⁰⁻³³³.

2.5.2.4. *Actividad sobre la MAO*

Diferentes estudios describen la actividad inhibidora de la MAO del *t*-RESV. Si bien algunos trabajos señalan que presenta una potencia similar para inhibir ambas isoformas, en otros se afirma que presenta una mayor potencia y selectividad por la isoforma A³³⁴. Se evaluaron también como inhibidores de MAO, una serie de derivados

dímeros de isoprenil-resveratrol (**Figura 37**) que, en general, resultaron ser activos y selectivos sobre la isoforma B³³⁵.

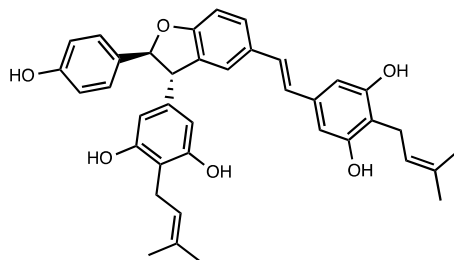


Figura 37. Estructura química de derivados dímeros de isoprenil-resveratrol

Se estudiaron también híbridos de indazol-resveratrol (**Figura 38**) que mostraron una inhibición moderada de la MAO. La introducción de un anillo de indazol en la estructura del RESV, disminuye la actividad sobre la isoforma A pero aumenta la actividad inhibidora de la isoforma B. El compuesto más activo de la serie como inhibidor de MAO-B resultó ser siete veces más potente que la iproniazida, inhibidor no selectivo e irreversible y utilizado como compuesto de referencia. Además, al analizar su REA, se observó que la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 4 del fenilo mejora sustancialmente la inhibición de MAO-A, lo que podría sugerir que el 4-OH en el anillo de fenilo es necesario para una actividad potente frente a MAO-A. La sustitución con grupos electrodonadores disminuye la actividad inhibidora de la MAO-B. Por el contrario, los sustituyentes electroattractores confieren a estas moléculas mejor actividad inhibidora de esta isoforma³³⁶.

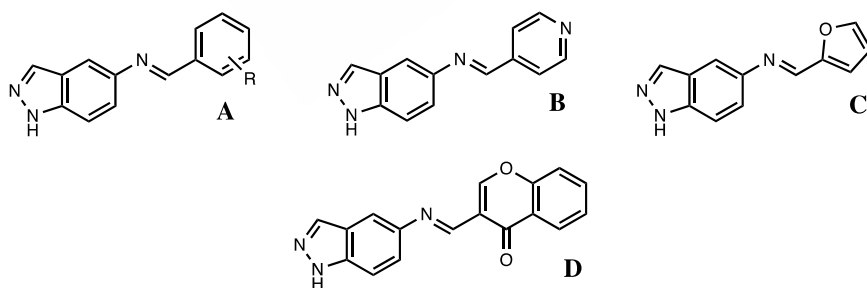


Figura 38. Estructura química de análogos híbridos indazol-resveratrol

La sustitución del segundo anillo bencénico por distintos heterociclos arrojó diferentes resultados. Así, la sustitución por una piridina (**Figura 38B**) conlleva a una pérdida de la actividad sobre ambas isoformas, mientras que la sustitución por un grupo furano (**Figura 38C**), mantiene la actividad inhibidora de la MAO-B y potencia la de la isoforma A. Del mismo modo, la sustitución de benceno por una cromona (**Figura 38D**) produjo un aumento significativo de la selectividad por la MAO-B³³⁷.

2.6. CURCUMINA

2.6.1. Origen

La curcumina es un pigmento amarillo obtenido del rizoma de la cúrcuma (*Curcuma longa*, Zingiberaceae), que se conoce químicamente como 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadien-3,5-diona o diferuloilmetano (**Figura 39**) y que fue aislada por primera vez en el año 1815 por Vogel y Pelletier³³⁸.

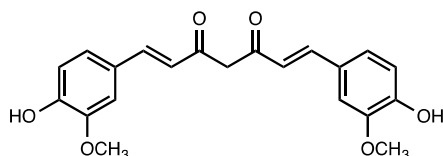


Figura 39. Estructura química de la curcumina

Durante siglos se ha utilizado en la medicina ayurvédica para tratar diversas afecciones, como la inflamación, las úlceras cutáneas y los trastornos hepáticos. Aunque las bases de datos actuales recogen casi 9.000 publicaciones sobre la curcumina, hasta 1990 había menos de 100 artículos publicados sobre este agente nutraceutico^{34,339}.

El primer ensayo clínico de la curcumina fue realizado por Oppenheimer en 1937 para examinar los efectos de *curcumen* o *curcumat* (formulación que contiene de 0,1 a 0,25 g de curcumina sódica y 0,1 g de colato de calcio) en las enfermedades biliares humanas³⁴⁰.

Estructuralmente existen al menos dos formas tautoméricas de la curcumina, la forma ceto y la forma enol. Ambas poseen actividades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antivirales, antibacterianas y antidiabéticas^{341,342}, quizá atribuibles a los grupos metoxilo, hidroxilo, carbonilo α,β -insaturado y dicetona de su estructura molecular^{343,344}. Además, se ha descrito un papel beneficioso contra varias enfermedades neurodegenerativas³⁴⁵ como la EP³⁴⁶, la EA³⁴⁷, la ELA, la lesión cerebral, la neurodegeneración relacionada con el envejecimiento y las enfermedades psíquicas y neurológicas como la esquizofrenia, la depresión, la epilepsia, el dolor neuropático y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob³⁴⁵.

Desafortunadamente, la curcumina presenta una serie de características que obstaculizan, en cierta manera, su actividad como potencial fármaco pues presenta una escasa solubilidad en agua, gran inestabilidad química y baja biodisponibilidad. Los factores principales que contribuyen a la baja biodisponibilidad de la curcumina tanto en plasma como en tejidos pueden estar asociados con su mala absorción, metabolismo rápido y eliminación sistémica también rápida. Además, se cree que la presencia de un grupo metileno activo y una fracción de β -dicetona hacen que la curcumina sea inestable en condiciones fisiológicas³⁴⁸.

Debido a estos problemas e impulsados por sus potenciales propiedades terapéuticas, se han buscado alternativas para mejorar su farmacocinética mediante el uso de adyuvantes, formas liposomales, nanopartículas, complejos con fosfolípidos, curcumina reformulada con diversos aceites o con inhibidores de su metabolismo y profármacos^{349,350}. Entre las formulaciones de curcumina desarrolladas hasta ahora, la formulación *LongVida* (VS Corp[®]) ha conseguido aumentar la biodisponibilidad mediante un proceso de micro-encapsulación sólido-lípida, alcanzándose un máximo de 22 mg/L en plasma. Este es un buen resultado ya que las primeras formulaciones de curcumina no alcanzaron el umbral de detección de la misma³⁵⁰.

Hasta la fecha, se han completado más de 100 ensayos clínicos diferentes con curcumina que muestran claramente su seguridad, tolerabilidad y su eficacia contra diversas enfermedades crónicas en humanos. Sin embargo, se necesitan más ensayos clínicos en diferentes poblaciones para demostrar su potencial contra diferentes enfermedades crónicas.

De la misma forma, también se han buscado análogos estructurales o derivados de la curcumina, con la idea de mejorar su biodisponibilidad. Kocaadam y cols., por ejemplo, han reportado que tanto la demetoxicurcumina como la bidemetoxicurcumina, análogos naturales de la curcumina, tienen una actividad biológica similar a la curcumina³⁵¹.

Se han sintetizado otros derivados de curcumina observando que aquellos que presentan un grupo metilo en el metileno en α al carbonilo o un carbonilo en el anillo de

fenilo, muestran una actividad antioxidante mucho mayor en comparación con la curcumina³⁵².

Modificaciones químicas en la molécula de la curcumina tales como la inclusión de grupos hidroxilo fenólicos, acilación, alquilación, glucosilación y amino acilación pueden mejorar su biodisponibilidad y hacerla más eficaz³⁵².

La curcumina también ha demostrado un efecto sinérgico con otros nutraceuticos como el resveratrol³⁵³, las catequinas³⁵⁴, la quercetina³⁵⁵ y la genisteína³⁵⁶. Pero no sólo es capaz de ejercer un efecto sinérgico con compuestos naturales, sino que también se han reportado diferentes asociaciones de curcumina con fármacos en los que la curcumina ha potenciado su efecto. En un estudio prospectivo aleatorizado, se evaluó el efecto terapéutico de la quercetina y la curcumina (FlogMEV) en combinación con prulifloxacin en pacientes con prostatitis bacteriana crónica, y se descubrió que FlogMEV mejora la eficacia clínica de la prulifloxacin^{353,354}.

2.6.2. Actividad farmacológica

Se sabe que la curcumina actúa sobre diferentes tipos de proteínas como Nrf2, β -catenina, NF- κ B, p38, MAPK, COX-2, 5-LOX, PGE2, FOXO3, iNOS, ERO, ciclina D1, factor de crecimiento endotelial vascular, glutatión, PLA2 citosólica, p-Tau y TNF- α , entre otras, modulando múltiples vías de señalización celular vinculadas a diferentes enfermedades crónicas, lo que sugiere que este polifenol presenta un marcado carácter multidiana³⁵⁵.

Tuorkey y cols. recientemente han propuesto un mecanismo plausible a través del cual la curcumina puede ejercer sus múltiples efectos: la regulación epigenética. Muchos estudios recientes la describen como un potente modulador epigenético en diferentes enfermedades como trastornos neurológicos, inflamación, diabetes y diferentes tipos de cáncer³⁵⁵.

Las funciones reguladoras epigenéticas de la curcumina incluyen principalmente la inhibición de las metiltransferasas de ADN, la regulación de las modificaciones de histonas a través de los efectos sobre las acetiltransferasas de histonas y las desacetilasas de histonas y la regulación de los micro ARN^{356,357}. La curcumina también

modula varias vías proteosómicas³⁵⁸ y altera el metabolismo del glucógeno a través de la inhibición selectiva de la fosforilasa cinasa³⁵⁹.

2.6.2.1. Actividad antioxidante

Los mecanismos antioxidantes de la curcumina han sido recientemente el foco de interés de químicos y biólogos. La mayoría de los antioxidantes tienen un grupo funcional fenólico o un grupo dicetona. La curcumina es un antioxidante único. Como hemos mencionado previamente, contiene una variedad de grupos funcionales, incluido el grupo β -dicetona, dobles enlaces carbono-carbono y anillos de fenilo con sustituyentes hidroxilo y metoxilo^{360,361}.

Existen diferentes teorías para explicar el efecto antioxidante de la curcumina. Jovanovic y cols. concluyeron que la curcumina es un excelente donante de átomos de hidrógeno, al donar en soluciones neutras, tanto acuosas como de acetonitrilo, el átomo de hidrógeno del metileno central en lugar de hacerlo del grupo fenólico³⁶². Por otro lado, Barclay y cols. propusieron que la curcumina es un antioxidante fenólico clásico que dona átomos de hidrógeno del grupo fenólico³⁶³. Priyadarsini y cols. también han afirmado que el grupo fenólico es esencial para la actividad secuestradora de radicales libres y que la presencia del grupo metoxilo aumenta aún más la actividad³⁶⁴.

Los estudios realizados a partir de cálculos teóricos de densidad funcional, demostraron que la forma enol de la curcumina es significativamente más estable que la forma diceto y que la entalpía de disociación del enlace fenólico O:H es significativamente más baja que la del central O:H, lo que sugiere que la abstracción del átomo de hidrógeno se lleva a cabo en el grupo fenólico. También se señaló que la contribución relativa del grupo fenólico y del grupo metileno central a la actividad antioxidante depende del radical de ataque y del medio de reacción³⁶⁵⁻³⁶⁷.

Litwinienko e Ingold llevaron a cabo un estudio en diferentes disolventes, ionizantes y no ionizantes, para resolver la controversia del mecanismo de transferencia secuencial de electrones, por el cual, la curcumina ejerce su acción antioxidante. Gracias a sus estudios se sabe que en disolventes que soportan la ionización, la curcumina reacciona con radicales electrofílicos inicialmente en el resto cetoenol ionizado y los radicales neutros resultantes pierden un fotón fenólico, produciendo así el

mismo radical fenoxilo que se habría formado por la transferencia de átomos de hidrógeno del grupo hidroxilo fenólico del anión curcumina a los radicales. Sin embargo, en disolventes no ionizantes el mecanismo de transferencia secuencial de electrones con pérdida de protones no puede ocurrir, y las reacciones involucran únicamente la transferencia de átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo fenólico de la curcumina neutra al radical³⁶⁵⁻³⁶⁷.

Recientes estudios *in vitro* en los que se evalúa la actividad antioxidante de una serie de derivados de curcumina, tales como análogos de curcumina monocarbonílicos, análogos de curcumina fusionados cíclicamente con piridina o con indol, han aportado información esencial para el futuro diseño y síntesis de nuevos derivados de curcuminas³⁶⁸ (**Figura 40**).

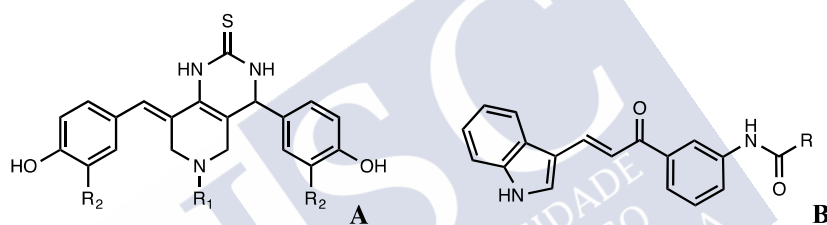


Figura 40. Estructura química de los análogos de curcumina fusionados cíclicamente con piridina (**A**) o indol (**B**)

Así pues, al analizar diferentes derivados de curcumina como antioxidantes, se han establecido ciertas condiciones estructurales para la obtención de un buen antioxidante a partir de la estructura base de la curcumina. Por un lado, el grupo hidroxilo fenólico es el componente más esencial en la estructura antioxidante. Esto se debe a que el grupo hidroxilo en el anillo de benceno y el radical libre de oxígeno reaccionan y generan radicales libres semiquinoides estables, terminando así la reacción³⁶⁷.

Por otro lado, es necesario la existencia de un sustituyente donador de electrones en el anillo de benceno en la posición *orto* al grupo hidroxilo fenólico, puesto que si existe un grupo aceptor, la potencia antioxidante resultante es menor. Por ejemplo, un grupo metoxilo, conduce a una disminución en la energía de disociación de enlace del hidroxilo fenólico, aumentando así la actividad^{367,368}.

Por último, el impedimento estérico de los grupos hidroxilo fenólicos debe ser limitado. Se ha visto que análogos con isopropilo y *terc*-butilo son menos activos que análogos con metilo, etilo y etoxilo^{367,368}.

La inhibición de la peroxidación lipídica llevada a cabo por la curcumina se atribuye principalmente a la eliminación de los radicales libres reactivos involucrados en la peroxidación. Se ha estudiado su potencial actividad antioxidante en cultivos de neuronas corticales de rata, demostrando que la curcumina es capaz de secuestrar ERO, resultando incluso cuatro veces más eficaz que el Trolox. Esta propiedad está relacionada con dos de sus subunidades estructurales: los hidroxilos fenólicos y el α -metileno a los dos carbonilos, ya que estos son capaces de transferir radicales de hidrógeno que reaccionan con ERO como se explicó previamente, neutralizando el posible daño celular³⁶⁹.

La suplementación con curcumina se ha considerado recientemente como un enfoque nutricional alternativo para reducir el daño oxidativo y la patología amiloidea asociada con la EA. Los estudios basados en modelos animales han indicado beneficios potenciales en la EA y la EP^{370,371}.

2.6.2.2. Actividad antiinflamatoria

La curcumina presenta propiedades antiinflamatorias en distintos tipos de enfermedades tales como el asma bronquial, la uveítis, la periodontitis y las enfermedades inflamatorias del intestino^{372,373}.

Regula negativamente varias citocinas, como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e IL-1 β , la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP)-1 (también conocida como CCL2), varias enzimas inflamatorias y factores de transcripción como el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3)³⁵⁵. Al suprimir la producción de TNF- α , inhibe la vía de NF- κ B que conduce a la expresión de genes inflamatorios como los que codifican COX-2, LOX, moléculas de adhesión celular, citocinas inflamatorias, quimiocinas e iNOS^{374,375}. Se ha descrito que reduce los niveles del ARNm e inhibe la expresión de la proteína iNOS y la producción de NO en células RAW 264.7 estimuladas con LPS o interferón- γ , en macrófagos peritoneales aislados de ratón BALB/c y en el hígado de ratones tratados con LPS^{376,377}.

2.6.2.3. *Inhibición enzimática*

COX y LOX

Se ha observado que la curcumina ingerida en la dieta inhibe significativamente la fosfolipasa A2 (PLA2) en la mucosa colónica y los tumores, lo que lleva a una menor liberación de AA de los fosfolípidos, alterando las actividades COX y LOX y modificando los niveles de PGE2³⁷⁸.

La curcumina disminuye la expresión de la COX-2 a nivel transcripcional, pero se ha observado que su mecanismo de acción no se limita a la inhibición de la producción de PG a través de la inhibición de la expresión de la COX-2, sino que también inhibe directamente su actividad enzimática. Además, hay evidencias que indican que la curcumina administrada en la dieta inhibe la actividad de la LOX. Se ha demostrado que los metabolitos catalizados por la LOX promueven la adhesión de las células tumorales, estimulan su propagación y aumentan el potencial metastásico³⁷⁸.

AChE

La curcumina inhibe la actividad de la AChE. Un estudio reciente ha descrito que presenta una energía de acoplamiento con la enzima muy baja, lo que demuestra una gran afinidad de unión. Para ello, la estructura molecular de la curcumina debe adoptar una geometría de U; esta transición conformacional facilita que la curcumina forme una interacción fuerte con el sitio activo de la enzima³⁷⁹.

En un estudio preclínico llevado a cabo con ratas que presentaban un aumento de la actividad de la AChE y de la adenosina desaminasa y un deterioro de la memoria inducido por Cd²⁺, se observó que la curcumina era capaz de revertir las actividades de ambas enzimas a los niveles de los controles³⁸⁰. También se observó que el Cd²⁺ es capaz de producir un aumento significativo de los niveles de ARNm de AChE y que la curcumina revierte este efecto. En conclusión, la curcumina posee actividad inhibidora de AChE y reduce el nivel de expresión del gen de ARNm de AChE en ratas expuestas a Cd²⁺, proporcionando así alguna evidencia bioquímica y molecular sobre su efecto terapéutico en el tratamiento de trastornos neurológicos, incluida la EA^{380,381}.

2.6.2.4. Curcumina en la EP

Diversos estudios apuntan hacia el interés de los mecanismos de neuroprotección que presenta la curcumina para su utilización en el tratamiento de la EP.

Su actividad antioxidante en células dopaminérgicas MES23.5 puede ser debida a que produce un incremento en la expresión de la SOD y una disminución en la acumulación intracelular de ERO³⁸². Se ha observado también que alivia el agotamiento de DA y reduce la actividad de la MAO-B frente a la toxicidad inducida por MPTP. En el hipotálamo de rata parece reducir la generación o viabilidad de prostaglandinas, Glu, citocinas proinflamatorias y los niveles de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), un marcador de proliferación astrocítica³⁸³. Además, es capaz de restaurar el potencial de membrana mitocondrial y modula la translocación nuclear de NF- κ B mediante la inhibición de IL-6 y TNF- α ³⁸⁴. La administración previa o posterior de curcumina a ratas tratadas con 6-hidroxidopamina (6-OHDA), reduce la pérdida neuronas dopaminérgicas y atenúa la disminución de DOPAC y HVA en el estriado³⁸⁵ al prevenir la fosforilación de c-Jun y la activación de la Casp3³⁸⁶.

Un estudio comparativo de trece ensayos preclínicos indicó que la curcumina podría mejorar la función neuroconductual y restaurar los niveles de tirosina, DA y DOPAC en comparación con el grupo placebo, lo que sugiere que ejerce neuroprotección en modelos animales de EP probablemente a través de su actividad antioxidante, antiinflamatoria y anti-apoptótica, atenuando la pérdida de neuronas dopaminérgicas en el SNC³⁸⁷.

2.6.2.5. Curcumina en la EA

En relación con la EA, los estudios *in vitro* han proporcionado datos sobre la capacidad de la curcumina para reducir los niveles de A β y se ha propuesto su posible capacidad para modular el procesamiento de Tau³⁸⁸⁻³⁹⁰.

Se han identificado varios mecanismos por los cuales la curcumina regula la producción de A β , entre los cuales se encuentran la estabilización de una forma inmadura de la APP, la reducción del ARNm que codifica para BACE1^{391,392} e incluso su capacidad para prevenir la regulación positiva de APP y BACE1 inducida por altos niveles de iones metálicos³⁹³. Otro estudio *in vitro* ha demostrado su capacidad de

eliminación de A β . Este proceso se cree que está producido por la fagocitosis de las placas de A β al ejercer una estimulación del sistema inmune³⁹⁴.

Posteriormente los estudios *in vivo* también han demostrado una disminución en la deposición de agregados de A β y una activación microglial reducida, lo que resulta en una reducción de la inflamación y el daño oxidativo³⁹⁵.

La curcumina posee una más que demostrada capacidad para inhibir *in vitro* la actividad de la glucógeno sintasa cinasa 3 β (GSK-3 β). Debido a ello, podría reducir la producción de ovillos neurofibrilares y así ejercer una modulación sobre la pTau; sin embargo, esta actividad no está suficientemente contrastada³⁹⁶.





JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS





3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El gran impacto social de la EA y la EP y la carencia de un tratamiento eficaz, que consiga detener o revertir el proceso y no únicamente retardar su avance, justifica la necesidad de desarrollar nuevas moléculas, potenciales candidatos a fármacos.

La naturaleza multifactorial y la compleja etiología, basada en procesos poco específicos que subyace a la fisiopatología de estas enfermedades neurodegenerativas, hace necesario disponer de moléculas multidiana, capaces de actuar de forma simultánea sobre múltiples dianas terapéuticas implicadas en la patogenia de la enfermedad.

Actualmente los IMAO-B se utilizan para aliviar los síntomas motores de la EP, mientras que los inhibidores de la AChE son, junto con la memantina, los únicos fármacos que han demostrado ser útiles para el tratamiento de la EA, retrasando la progresión de la misma.

El desarrollo de nuevas moléculas que sumen a su actividad inhibidora de la MAO-B o inhibidora de ChE una actividad neuroprotectora, podría ser útil para el tratamiento de estas enfermedades, pues no sólo actuarían sobre su sintomatología, sino que permitirían detener la muerte celular y fomentar la recuperación de las poblaciones neuronales ya afectadas.

Los ligandos multidiana representan una estrategia para la terapia multidiana que evita las interacciones farmacodinámicas y farmacocinéticas que podrían presentarse con la administración conjunta de varios fármacos. Tradicionalmente, el diseño de ligandos multidiana se ha basado en tres estrategias diferentes: conjugación, fusión e hibridación de farmacóforos para obtener una única estructura con diferentes actividades farmacológicas.

La **hipótesis** de este trabajo de investigación es que la cumarina, el resveratrol y la curcumina son farmacóforos adecuados para la obtención de ligandos multidiana, con buen perfil farmacocinético y potenciales candidatos a fármacos para el tratamiento de

estas enfermedades neurodegenerativas. Esta hipótesis está basada en las actividades farmacológicas descritas para estos tres productos naturales.

Por tanto, se plantea como objetivo general el estudio farmacológico *in vitro* e *in vivo*, sobre diferentes dianas implicadas en la EP y EA, de nuevas moléculas con estructura cumarínica: análogos híbridos resveratrol-cumarina, amidocumarinas sustituidas y análogos híbridos curcumina-cumarina, cuya estructura general se representa a continuación (**Figura 41**).

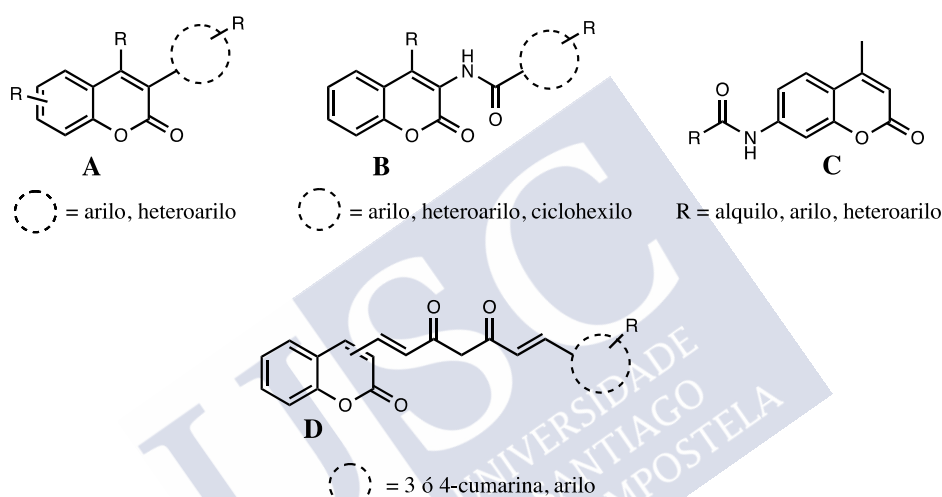


Figura 41. Análogos híbridos resveratrol-cumarina (**A**), derivados de 3-amidocumarina (**B**), derivados de 7-amidocumarina (**C**) y análogos híbridos curcumina-cumarina (**D**).

Para evaluar el potencial terapéutico de los nuevos derivados de cumarina, siguiendo un cribado farmacológico, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1) Estudiar su actividad *in vitro* como:

- Inhibidores de la MAO
- Inhibidores de AChE y BuChE
- Inhibidores de BACE1
- Inhibidores de COX
- Neuroprotectores

2) Estudiar los mecanismos de acción de los derivados de cumarina con mayor actividad neuroprotectora:

- Evaluar su actividad secuestradora de radicales libres
- Evaluar su actividad sobre la producción de ERO en células SH-SY5Y
- Evaluar sus efectos sobre la transcripción del ARNm codificante para NF- κ B, Nrf2, Casp3 y TNF- α

3) Estudiar la biodisponibilidad de los derivados de cumarina más prometedores:

- Calcular sus propiedades físico-químicas y predecir su capacidad de paso a través de membranas biológicas incluyendo la BHE
- Determinar *in vitro* su capacidad para atravesar la BHE
- Evaluar *in vivo* su biodisponibilidad en ratones

4) Estudiar, para aquellas moléculas cuyos resultados de actividad *in vitro* como inhibidores de MAO-B o inhibidores de AChE resulten más prometedores, su actividad *in vivo* en ratones modelo de EP y de EA.

Los estudios que nos proponemos realizar en este trabajo de investigación presentan un interés sanitario y científico relevante, en la medida en que contribuirán a reportar los siguientes beneficios:

a) Obtener información útil a partir del análisis de la REA de los derivados de cumarina evaluados, para el diseño posterior y la síntesis química de nuevas moléculas con mayor potencial terapéutico como inhibidores de MAO, colinesterasas, COX, BACE1 y como neuroprotectores.

b) Facilitar el desarrollo y posterior introducción en terapéutica de nuevos fármacos multidiana con un buen perfil farmacocinético y un índice terapéutico más alto. En definitiva, fármacos más eficaces y menos tóxicos que los comercializados hasta ahora, capaces de aportar nuevas soluciones al tratamiento de diferentes enfermedades neurodegenerativas como la EP o la EA.



MATERIAL Y MÉTODOS





4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. NUEVOS DERIVADOS DE CUMARINA OBJETO DE ESTUDIO

Los nuevos derivados de cumarina han sido sintetizados en el grupo del Dr. Eugenio Uriarte en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidade de Santiago de Compostela (USC) y en el grupo de la Dra. Carmen Terán en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidade de Vigo (UVigo) y corresponden a las series:

1. Análogos híbridos resveratrol-cumarina

- Derivados de 3-fenilcumarina (**Figura 42, Tabla 2**)
- Derivados de 3-(tiofen-2-il)cumarina (**Figura 43, Tabla 3**)
- Derivados de 3-(6-oxo-1,6-dihidropiridazin-3-il)cumarina (**Figura 44, Tabla 4**)
- Derivados de 3-(piridazin-3-il)cumarina (**Figura 45, Tabla 5**)

2. Derivados de amidocumarina

- Derivados de 3-benzamidocumarina (**Figura 46, Tabla 6**)
- Derivados de 3-ciclohexilamidocumarina (**Figura 47, Tabla 7**)
- Derivados de 3-heteroarilamidocumarina (**Figura 48, Tabla 8**)
- Derivados de 7-benzamido-4-metilcumarina (**Figura 49, Tabla 9**)
- Derivados de 7-alkilamido-4-metilcumarina (**Figura 50, Tabla 10**)
- Derivados de 7-heteroarilamido-4-metilcumarina (**Figura 51, Tabla 11**)

3. Análogos híbridos curcumina-cumarina

- 3,3'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)bis(7,8-dihidroxicumarina) (**Figura 52**)
- Derivados de 4,4'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina (**Figura 53, Tabla 12**)
- Derivados de 3-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina (**Figura 54, Tabla 13**)
- Derivados de 4-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina (**Figura 55, Tabla 14**)

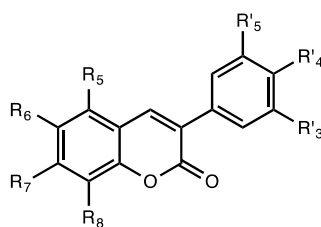


Figura 42. Estructura química común de los derivados de 3-fenilcumarina

Tabla 2. Radicales presentes en las distintas posiciones de los derivados de 3-fenilcumarina.

COMPUESTO	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R' ₃	R' ₄	R' ₅
CUM9	H	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H
CUM10	H	H	OCH ₃	H	H	OH	H
CUM11	H	OH	H	H	OH	OH	OH
CUM12	H	H	OH	H	H	OCH ₃	H
CUM21	H	H	OH	H	OCH ₃	H	OCH ₃
CUM21C	H	H	OH	H	OH	H	OH
CUM32	H	OH	H	OH	H	OH	H
CUM41	H	H	OH	H	H	OH	H
CUM51	H	OH	H	OH	OH	H	OH
CUM61	H	OH	H	OH	OH	OH	OH
CUM71	H	H	OH	H	OH	OH	OH
CUM81	H	OH	H	H	H	OH	H
CUM91	H	OH	H	H	OH	H	OH
CUMa	H	H	H	H	H	OH	H
CUMla	H	H	OH	H	H	H	H
SMA1	H	H	H	H	OH	OH	OH
SMB1	H	OH	OH	H	OH	OH	OH
JLG5b	H	H	OH	OH	OH	OH	H
JLG9b	OH	H	OH	H	H	H	H
JLG12b	OH	H	OH	H	OH	OH	H
MJM43b	H	H	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	H

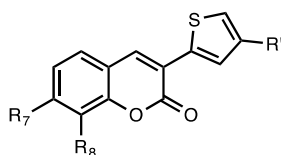


Figura 43. Estructura química común de los derivados de 3-(tiofen-2-il)cumarina

Tabla 3. Radicales presentes en las distintas posiciones de los derivados de 3-(tiofen-2-il)cumarina

COMPUESTO	R ₇	R ₈	R'
MJM450	H	OH	H
MJM451	OH	H	H

COMPUESTO	R ₇	R ₈	R'
MJM452	OH	OH	H
MJM465	H	OH	Br
MJM470	OH	H	Br
MJM471	OH	OH	Br

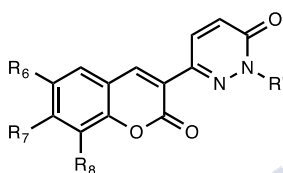


Figura 44. Estructura química común de los derivados de 3-(6-oxo-1,6-dihidropiridazin-3-il)cumarina

Tabla 4. Radicales presentes en las distintas posiciones de los derivados de 3-(6-oxo-1,6-dihidropiridazin-3-il)cumarina.

COMPUESTO	R ₆	R ₇	R ₈	R'
MC74	CH ₃	H	H	Bn
MC76	OCH ₃	H	H	Bn
MC77	H	H	OCH ₃	Bn
MC78	CH ₃	H	H	H
MC79	H	OCH ₃	H	Bn
MC80	H	H	CH ₃	Bn
MC81	H	CH ₃	H	Bn
MC84	CH ₃	H	H	CH ₃
MC85	OCH ₃	H	H	CH ₃
MC86	H	H	OCH ₃	CH ₃
MC87	H	H	CH ₃	CH ₃
MC88	H	OCH ₃	H	CH ₃
MC89	H	CH ₃	H	CH ₃
MC91	OCH ₃	H	H	H
MC95	H	H	OCH ₃	H
MC96	H	H	CH ₃	H
MC97	H	OCH ₃	H	H
MC98	H	CH ₃	H	H

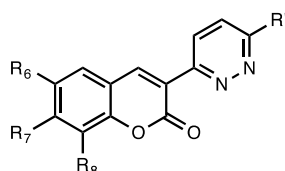


Figura 45. Estructura química común de los derivados 3-(piridazin-3-il)cumarina

Tabla 5. Radicales presentes en las distintas posiciones de los derivados de 3-(piridazin-3-il)cumarina.

COMPUESTO	R ₆	R ₇	R ₈	R'
MC82	CH ₃	H	H	Cl
MC93	CH ₃	H	H	OCH ₃
MC99	OCH ₃	H	H	Cl
MC100	OCH ₃	H	H	OCH ₃
MC101	H	H	OCH ₃	Cl
MC102	H	H	CH ₃	Cl
MC103	H	OCH ₃	H	Cl
MC104	H	CH ₃	H	Cl
MC105	H	H	OCH ₃	OCH ₃
MC106	H	H	CH ₃	OCH ₃
MC107	H	OCH ₃	H	OCH ₃
MC108	H	CH ₃	H	OCH ₃
MC124	H	H	H	Cl
MC143	H	H	H	Br
MC144	CH ₃	H	H	Br
MC145	OCH ₃	H	H	Br
MC146	H	CH ₃	H	Br
MC147	H	OCH ₃	H	Br
MC148	H	H	CH ₃	Br
MC149	H	H	OCH ₃	Br
MC150	Br	H	H	Br
MC151	H	Br	H	Br
MC152	H	H	Br	Br
MC153	Cl	H	H	Br
MC154	H	H	Cl	Br
MC155	Br	H	H	Cl
MC156	H	Br	H	Cl
MC157	H	H	Br	Cl
MC158	Cl	H	H	Cl
MC159	H	H	Cl	Cl

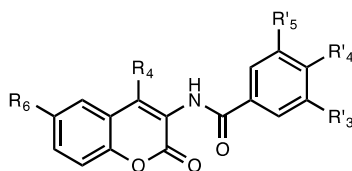


Figura 46. Estructura química común de los derivados de 3-benzamidocumarina

Tabla 6. Radicales presentes en las distintas posiciones de los derivados de 3-benzamidocumarina.

COMPUESTO	R ₄	R ₆	R' ₃	R' ₄	R' ₅
MJM223	H	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
MJM229	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
MJM246	H	H	H	H	H
MJM247	H	H	H	OCH ₃	H
MJM249	H	H	H	CH ₃	H
MJM252	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H
MJM253	H	H	H	Cl	H
MJM254	H	H	Cl	Cl	H
MJM255	H	H	H	NO ₂	H
MJM256	OH	H	H	H	H
MJM257	OH	H	H	OCH ₃	H
MJM258	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	H
MJM259	OH	H	H	CH ₃	H
MJM260	OH	H	H	Cl	H
MJM261	OH	H	H	NO ₂	H
MJM280	OH	H	Cl	Cl	H
MJM324	H	CH ₃	H	CH ₃	H

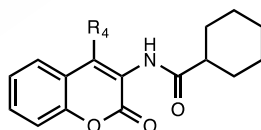


Figura 47. Estructura química común de los derivados de 3-ciclohexilamidocumarina

Tabla 7. Radicales presentes en las distintas posiciones de los derivados de 3-ciclohexilamidocumarina .

COMPUESTO	R ₄
MJM195	H
MJM197	OH

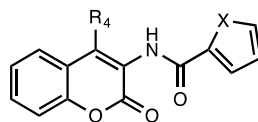


Figura 48. Estructura química común de los derivados de 3-heteroarylamidocumarina

Tabla 8. Radicales presentes en las distintas posiciones de los derivados de 3-heteroarylamidocumarina.

COMPUESTO	R ₄	X
MJM296	H	S
MJM297	OH	S
MJM312	H	O
MJM313	OH	O
MJM320	H	CH=N
MJM321	OH	CH=N

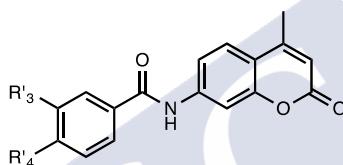


Figura 49. Estructura química común de los derivados de 7-benzamido-4-metilcumarina

Tabla 9. Radicales presentes en las distintas posiciones de los derivados de 7-benzamido-4-metilcumarina.

COMPUESTO	R' ₃	R' ₄
MJM272	H	H
MJM273	H	OCH ₃
MJM275	H	CH ₃
MJM276	OCH ₃	OCH ₃
MJM277	H	Cl
MJM279	H	NO ₂

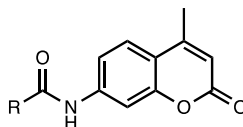


Figura 50. Estructura química común de los derivados de 7-alkilamido-4-metilcumarina

Tabla 10. Radicales presentes en las distintas posiciones de los derivados de 7-alkilamido-4-metilcumarina.

COMPUESTO	R
MJM286	H
MJM430	CH ₃
MJM508	CH ₃ CH ₃
MJM509	iso-propilo
MJM511	terc-butilo

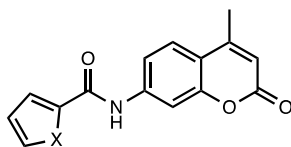


Figura 51. Estructura química común de los derivados de 7-heteroarilamido-4-metilcumarina

Tabla 11. Radicales presentes en las distintas posiciones de los derivados de 7-heteroarilamido-4-metilcumarina.

COMPUESTO	X
MJM340	S
MJM341	O

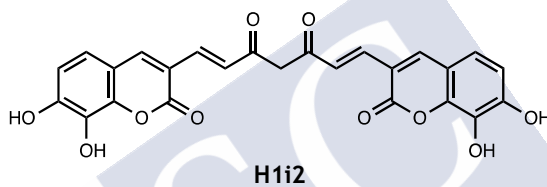


Figura 52. Estructura química del compuesto 3,3'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)bis(7,8-dihidroxycumarina)

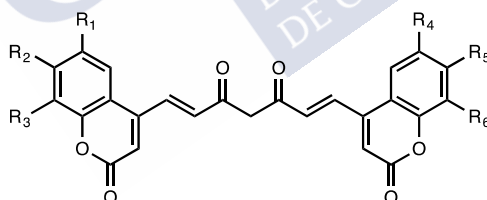


Figura 53. Estructura química común de los derivados de 4,4'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina

Tabla 12. Radicales presentes en las distintas posiciones de los derivados de 4,4'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina

COMPUESTO	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
A1A	H	OH	OH	H	OH	OH
B1B	OH	OH	H	OH	OH	H

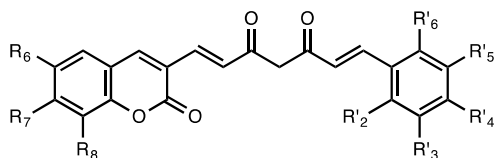


Figura 54. Estructura química común de los derivados de 3-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina

Tabla 13. Radicales presentes en las distintas posiciones de los derivados de 3-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina

COMPUESTO	R ₆	R ₇	R ₈	R' ₂	R' ₃	R' ₄	R' ₅	R' ₆
H1i3	H	OH	OH	OH	H	OH	H	OH
H1i5	H	OH	OH	OH	H	OH	OH	H
H1J2	H	OH	OH	OH	OH	OH	H	H
H1J4	H	OH	OH	H	OH	OH	OH	H
H1K3	OH	OH	H	OH	H	OH	H	OH
H1K5	OH	OH	H	OH	H	OH	OH	H
H1L2	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	H
H1L3	OH	OH	H	H	OH	OH	OH	H

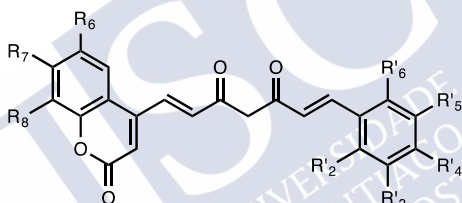


Figura 55. Estructura química común de los derivados de 4-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina

Tabla 14. Radicales presentes en las distintas posiciones de los derivados de 4-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina

COMPUESTO	R ₆	R ₇	R ₈	R' ₂	R' ₃	R' ₄	R' ₅	R' ₆
A1I	OH	OH	H	OH	H	OH	H	OH
A1J	OH	OH	H	H	OH	OH	H	OH
A1K	OH	OH	H	H	H	OH	OH	OH
A1L	OH	OH	H	H	OH	OH	OH	H
B1I	H	OH	OH	OH	H	OH	H	OH
B1K	H	OH	OH	H	H	OH	OH	OH
B1L	H	OH	OH	H	OH	OH	OH	H
I1I	OH	OH	H	H	OH	OH	H	
J1J	OH	OH	H	H	OH	OH		H
K1K	H	OH	OH	H	OH	OH	H	
L1L	H	OH	OH	H	OH	OH		H

4.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA MAO

4.2.1. Fármacos, reactivos y otros compuestos químicos

Los fármacos y compuestos químicos utilizados en los experimentos fueron el dimetilsulfóxido (DMSO), la moclobemida (gentilmente suministrada por los laboratorios Hoffman-La Roche), el hidrocloreuro de R-(-)-deprenilo (selegilina), la iproniazida, la isatina (Sigma-Aldrich S.A.), el hidrocloreuro de clorgilina, la sal sódica de resorufina, el hidrocloreuro de *p*-tiramina, el tampón fosfato sódico, la peroxidasa de rábano picante (suministrados en el kit para el ensayo de la MAO Amplex[®] Red Molecular Probes S.A.) y los nuevos derivados de cumarina descritos en las **Tablas 2-14**.

4.2.2. Preparación de las disoluciones de compuestos y fármacos y preparación de los tampones

Los nuevos derivados de cumarina se disolvieron en DMSO para preparar disoluciones stock de concentración 10 mM que se mantuvieron a -20 °C para su conservación. Los fármacos moclobemida, clorgilina e iproniazida, se disolvieron también en DMSO, mientras que el fármaco R-(-)-deprenilo se disolvió en agua Milli-Q[®]; preparándose en todos los casos disoluciones stock de concentración 10 mM. A partir de estas disoluciones stock se realizaron las adecuadas diluciones, empleando también como disolvente DMSO o agua Milli-Q[®], preparándolas en el mismo día de realización del experimento.

El tampón fosfato sódico proporcionado a una concentración 5 veces superior a la necesaria en el Kit de MAO Amplex[®] Red se diluyó en agua Milli-Q[®] (Millipore Ibérica S.A.) hasta la concentración adecuada.

El Amplex[®] Red se preparó a concentración 20 mM, disolviéndose en DMSO, el hidrocloreuro de *p*-tiramina se preparó a concentración 100 mM, disolviéndose en agua Milli-Q[®] y la peroxidasa de rábano picante se preparó a concentración 200 U/mL, disolviéndose en el tampón fosfato sódico (1X).

El Amplex[®] Red y los análogos híbridos cumarina-curcumina se mantuvieron en todo momento protegidos de la luz debido a su fotosensibilidad.

4.2.3. Determinación de la inhibición de las isoformas de la MAO

Los potenciales efectos de nuestros compuestos sobre la actividad de las isoformas de la MAO se determinaron midiendo la producción de H_2O_2 y, por consiguiente, de resorruфина a partir de *p*-tiramina (4-hidroxi-feniletilamina), utilizando el reactivo Amplex[®] Red y las isoformas de la MAO, presentes en la fracción microsomal, preparada a partir de células de insectos (BTI-TN-5B1-4) infectadas con baculovirus recombinantes que contienen insertos de ADNc de MAO-A o MAO-B humano (Sigma-Aldrich S.A.).

Estas isoformas de la MAO catalizan la oxidación de varios sustratos que contienen restos amino para originar los aldehídos correspondientes, amoníaco y H_2O_2 . La *p*-tiramina, que es oxidada a 4-hidroxifenilacetaldehído, es un sustrato común para la MAO-A y para la MAO-B³⁹⁷.

La producción de H_2O_2 catalizada por las isoformas de la MAO se puede detectar utilizando el reactivo Amplex[®] Red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina), una sustancia no fluorescente, altamente sensible, que reacciona con el H_2O_2 en presencia de la peroxidasa del rábano picante para producir una sustancia fluorescente, la resorruфина (Figura 56).

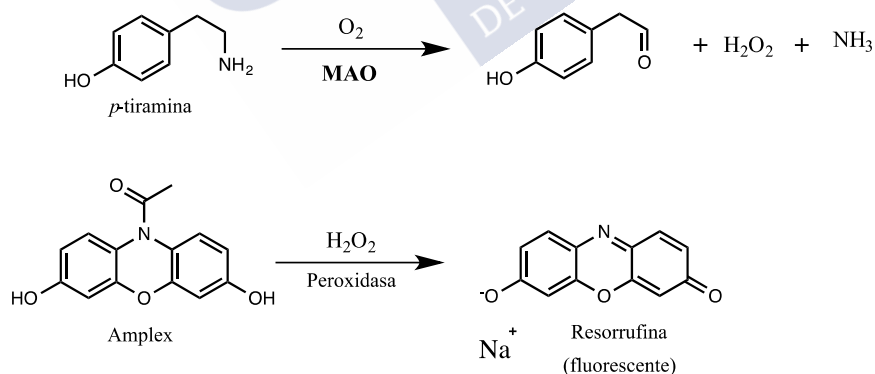


Figura 56. Esquema de las reacciones catalizadas por las isoformas de la MAO y la peroxidasa

En nuestros experimentos, la actividad de la MAO fue evaluada con el método mencionado anteriormente, siguiendo un procedimiento general, previamente descrito, con algunas modificaciones^{31,333}.

En primer lugar se incubaron 0,1 mL de tampón fosfato sódico (50 mM, pH 7,4) que contiene distintas concentraciones de los nuevos compuestos a estudiar (concentración final de DMSO $\leq 1\%$) o los inhibidores de referencia, y la cantidad de MAO-A o MAO-B recombinante humana requerida para obtener, en nuestras condiciones experimentales, la misma velocidad de reacción; es decir, para oxidar (en ausencia de los compuestos: grupo control) la misma concentración de sustrato: 165 pmoles de *p*-tiramina por minuto (MAO-A; 1,1 μg ; actividad específica: 150 nmoles de *p*-tiramina oxidados a *p*-hidroxifenilacetaldehído por minuto por mg de proteína; MAO-B: 7,5 μg ; actividad específica: 22 nmoles de *p*-tiramina transformados por minuto por mg de proteína). Dicha incubación se realizó durante 10 minutos a 37 °C en placas de 96 pocillos de fondo negro y plano (Microtest™ 96 well assay plate, BD Biosciences) ya colocadas en la cámara oscura del lector de fluorescencia. Después del periodo de incubación, la reacción se inició añadiendo (concentraciones finales) 200 μM de reactivo Amplex® Red, 1 unidad (U)/mL de peroxidasa de rábano picante y 1 mM de *p*-tiramina como sustrato, tanto para los estudios realizados con la MAO-A como para los realizados con la MAO-B.

La producción de H_2O_2 y, por consiguiente, de resorufina fue cuantificada a 37 °C en un lector de fluorescencia de placa (Fluo-star Optima™, BMG LABTECH) determinando la fluorescencia generada ($\lambda_{\text{excitación}}$ 545 nm, $\lambda_{\text{emisión}}$ 590 nm) durante 10 minutos, un período en el cual el incremento de la fluorescencia fue lineal desde el principio. Simultáneamente se llevaron a cabo experimentos control sustituyendo nuestros compuestos o los inhibidores de referencia con las disoluciones apropiadas de los vehículos. Además, la posible capacidad de los compuestos arriba indicados para modificar la fluorescencia generada en la mezcla de la reacción por una inhibición no enzimática (por ejemplo, por reacción directa con el reactivo Amplex® Red), fue evaluada añadiéndolos a soluciones que contenían exclusivamente el reactivo Amplex® Red en tampón fosfato sódico.

Los parámetros cinéticos (K_m y $V_{\text{máx}}$) de las dos isoformas de la MAO humana fueron determinados por regresión lineal (método de mínimos cuadrados), utilizando el programa Origin 5.0 (Microcal Software, Inc., Northampton, MA, EE.UU.), de los correspondientes dobles recíprocos de Lineweaver-Burk, siendo $X = 1/\text{concentración}$

molar de *p*-tiramina e $Y = 1/\text{velocidad de reacción (V)}$. La intersección en el eje Y, y la pendiente de esta regresión permitieron obtener $1/V_{\text{máx}}$ y $K_m/V_{\text{máx}}$, respectivamente.

Para determinar los pmoles de *p*-tiramina oxidados, se hizo una curva estándar empleando varias concentraciones de resorruфина, siendo $X = \text{pmoles de resorruфина}$ e $Y = \text{unidades arbitrarias de fluorescencia}$ y teniendo en cuenta que al ser la estequiometría de la reacción de formación de resorruфина 1:1, los pmoles producidos son equivalentes a los pmoles de *p*-tiramina oxidados.

4.2.4. Reversibilidad

Se realizaron experimentos de reversibilidad para evaluar el tipo de inhibición de la isoforma B de la MAO para los inhibidores más potentes, seleccionados en las diferentes series de compuestos evaluadas.

Se empleó un método de dilución y se utilizaron selegilina (inhibidor irreversible) e isatina (inhibidor reversible) como fármacos de referencia^{515,516}. En primer lugar, se prepararon diluciones 1000X CI_{50} experimental de los compuestos a evaluar. Posteriormente se preparó una disolución de la enzima MAO-B 100X (en relación a la concentración utilizada en los experimentos para la determinación de la inhibición de la actividad enzimática antes descritos) en tampón fosfato sódico (50 mM, pH 7,4). Se añadieron 0,2 μL de la disolución de compuesto sobre 1,8 μL de la disolución de la enzima y las disoluciones obtenidas se incubaron en hielo durante 30 min. En los experimentos control, la disolución del compuesto fue sustituida por DMSO (utilizado como vehículo). Una vez transcurrido el periodo de incubación, las diferentes disoluciones se diluyeron 100 veces con tampón fosfato, añadiendo 198 μL del mismo. Posteriormente, se tomaron 50 μL de cada una de las disoluciones, que se llevaron a una placa de 96 pocillos de fondo negro y plano (Microtest™ 96 well assay plate, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.), incubándose a continuación a 37 °C durante 3 min. Posteriormente, se añadieron, 50 μL de tampón fosfato conteniendo una mezcla de *p*-tiramina, peroxidasa de rábano picante y Amplex® Red a las concentraciones descritas previamente. Finalmente, se determinó la fluorescencia generada como se describe en el apartado anterior.

4.2.5. Expresión de resultados

La actividad IMAO de los nuevos derivados de cumarina y de los fármacos de referencia se expresó como CI_{50} , es decir, como la concentración de cada compuesto necesaria para producir una disminución del valor control de la actividad enzimática de las isoformas de la MAO de un 50%. Los correspondientes valores de las CI_{50} , fueron calculados utilizando el programa informático OriginTM 5.0, a partir de las ecuaciones de las rectas obtenidas por regresión lineal (métodos de mínimos cuadrados) de los puntos resultantes al representar el log de la concentración molar del compuesto estudiado (eje de abscisas) frente al porcentaje de inhibición de la actividad MAO control conseguido con las correspondientes concentraciones de cada compuesto (eje de ordenadas). Esta regresión lineal se realizó utilizando los datos obtenidos con 4-6 concentraciones de cada compuesto evaluado, capaces de inhibir la actividad enzimática control de las isoenzimas de la MAO entre el 20% y el 80%. En los casos en los que los compuestos no alcanzaron un porcentaje de inhibición superior al 50-60%, los datos se expresaron como % de inhibición enzimática a concentración 100 μ M. Además, se calculó el cociente $[CI_{50} \text{ (MAO-A)}]/[CI_{50} \text{ (MAO-B)}]$ como indicador del índice de selectividad en la inhibición mostrada sobre ambas isoformas.

Para la determinación de la reversibilidad se calculó el porcentaje de la pendiente ($\Delta U F/t$) respecto al control. Para los inhibidores reversibles el incremento de fluorescencia muestra un progreso lineal alcanzando al menos el 91% de la pendiente del control, mientras que si la inhibición es irreversible se alcanza solo el 9% de esta pendiente.

Salvo indicación contraria, los resultados de CI_{50} mostrados en el texto y en las tablas están expresados como la media \pm error estándar de la media (e.e.m.) de 5 experimentos. Los resultados de reversibilidad se expresan como la media \pm error estándar de la media (e.e.m.) de, al menos, 2 experimentos.

4.3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LAS COLINESTERASAS

4.3.1. Fármacos, reactivos y otros compuestos químicos

Los fármacos y compuestos químicos utilizados en los experimentos fueron el DMSO, la tacrina, la eserina, el cromógeno ácido 5,5'-mercaptobis-2-nitrobenzoico, los sustratos ioduro de acetiltiocolina o ioduro de butiriltiocolina (Sigma-Aldrich S.A.) y los nuevos derivados de cumarina descritos en las **Tablas 2-14**.

4.3.2. Preparación de las disoluciones de los compuestos y fármacos y preparación de los tampones

Los fármacos tacrina y eserina se disolvieron en agua Milli-Q® (Millipore Ibérica S.A., Madrid, España) para preparar disoluciones stock (10 mM) que se conservaron a -20 °C. A partir de estas disoluciones stock se realizaron las adecuadas diluciones, empleando también como disolvente agua Milli-Q®, preparándolas en el mismo día de realización del experimento.

La preparación de las nuevas moléculas para llevar a cabo los experimentos se realizó tal como se describió en el apartado **4.2.2**.

Para la elaboración del tampón fosfato (50 mM, pH 7,2) se procedió a la preparación de dos disoluciones en agua Milli-Q®, NaH_2PO_4 (50 mM) y Na_2HPO_4 (50 mM). Una vez preparadas, sobre la disolución de Na_2HPO_4 se añadió, poco a poco y con agitación constante, la disolución de NaH_2PO_4 hasta ajustar el pH en 7,2; este proceso requiere añadir un volumen de la disolución de NaH_2PO_4 aproximadamente igual a la mitad del volumen de la solución de Na_2HPO_4 .

La disolución de cromógeno (ácido 5,5'-mercaptobis-2-nitrobenzoico) se preparó a concentración 5 mM, disolviendo 1,9817 mg/mL en tampón fosfato (50 mM, pH 7,2).

Los sustratos, ioduro de acetiltiocolina o ioduro de butiriltiocolina, se prepararon a concentración 100 mM en tampón fosfato (50 mM, pH 7,2).

4.3.3. Determinación de la inhibición de las colinesterasas

Los potenciales efectos de los nuevos derivados de cumarina sobre la actividad de las colinesterasas (AChE y BuChE), se determinaron midiendo la producción de ácido

5-mercapto-2-nitrobenzoico (5-MNBA), un compuesto coloreado, que se forma a partir de la reacción de la tiocolina con el ácido 5,5'-mercaptobis-2-nitrobenzoico (cromógeno). Esta tiocolina se produce a partir de la reacción de hidrólisis entre el sustrato y la AChE recombinante humana o BuChE obtenida a partir de suero humano (Sigma-Aldrich S.A.). En el caso de la AChE, el sustrato fue la acetiltiocolina, y en el caso de la BuChE, la butiriltiocolina³⁹⁸ (**Figura 57**).

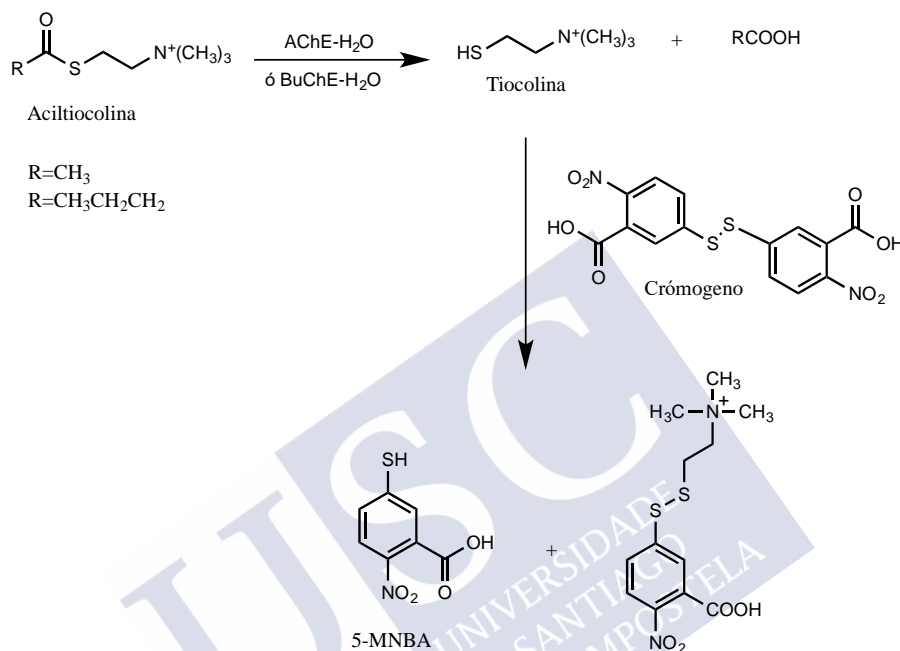


Figura 57. Esquema de la reacción catalizada por las ChEs

En primer lugar, se incubaron 90 μ L de tampón fosfato (50 mM, pH 7,2) conteniendo distintas concentraciones de los compuestos a estudiar (o los inhibidores de referencia) y 0,01 U/mL de enzima. Dicha incubación se realizó durante 5 minutos a 37 °C, después de haber agitado vigorosamente la mezcla, en placas de 96 pocillos transparentes y de fondo plano Microtest™ 96 well assay plate, (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) ya colocadas en la cámara oscura del lector de absorbancia.

Después del periodo de incubación, se añadió la disolución del cromógeno preparada (concentración final 0,25 mM). La reacción se inició añadiendo la disolución del sustrato (concentración final 5 mM) y a continuación se agitó nuevamente la mezcla. La producción de 5-MNBA fue cuantificada a 37 °C en un lector de absorbancia (Fluo-star Optima, BMG LABTECH, Offenburg, Alemania) determinando

la absorbancia generada (λ 405 nm) durante 10 minutos, un periodo en el cual el incremento de absorbancia fue lineal desde el principio.

La variación de absorbancia generada por unidad de tiempo es proporcional a la cantidad de tiocolina producida y por tanto, a la actividad de la colinesterasa. La absorbancia específica (utilizada para obtener los resultados finales) se calculó después de sustraer la absorbancia de fondo, determinada en la disolución en tampón fosfato de los compuestos a estudiar.

Los parámetros cinéticos (K_m y $V_{m\acute{a}x}$) de AChE y BuChE se calcularon por regresión lineal (método de mínimos cuadrados), utilizando el programa OriginTM 5.0, de los correspondientes dobles recíprocos de Lineweaver-Burk, siendo $X=1/\text{concentración molar de ioduro de acetil o butirilcolina}$ e $Y=1/\text{velocidad de reacción (V)}$. La intersección en el eje Y, y la pendiente de esta regresión, permitieron obtener $1/V_{m\acute{a}x}$ y $K_m/V_{m\acute{a}x}$, respectivamente.

4.3.4. Expresión de los resultados

La actividad inhibidora de las colinesterasas de los nuevos derivados de cumarina y de los fármacos de referencia se expresó como CI_{50} , es decir, como la concentración de cada compuesto necesaria para producir una disminución del valor control de la actividad enzimática de las colinesterasas de un 50%. Los correspondiente valores de las CI_{50} fueron calculados utilizando el programa informático OriginTM 5.0, a partir de las ecuaciones de las rectas obtenidas por regresión lineal (métodos de mínimos cuadrados) de los puntos resultantes al representar el log de la concentración molar del compuesto estudiado (eje de abscisas) frente al porcentaje de inhibición de la actividad colinesterasa control conseguido con las correspondientes concentraciones de cada compuesto (eje de ordenadas). Esta regresión lineal se realizó utilizando los datos obtenidos con 4-6 concentraciones de cada compuesto evaluado, capaces de inhibir la actividad control de las colinesterasas entre el 20% y el 80%. En los casos en los cuales los compuestos no alcanzaron un porcentaje de inhibición superior al 50-60%, los datos se expresaron como % de inhibición enzimática a concentración 100 μM .

Salvo indicación contraria, los resultados mostrados en el texto y en las tablas están expresados como la media \pm error estándar de la media (e.e.m.) de, al menos, 3 experimentos.



4.4. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE BACE1

4.4.1. Fármacos, reactivos y otros compuestos químicos

Los fármacos y compuestos químicos utilizados en los experimentos fueron el DMSO, el inhibidor de referencia Glu-Val-Asn-[(2R,4S,5S)-5-amino-4-hidroxi-2,7-dimetiloctanoil]-Ala-Glu-Phe (OM-99) (Sigma-Aldrich S.A.), la enzima β -secretasa (BACE1), el sustrato para la reacción enzimática FL-BACE1-biotina (*Fluorescein-EVNLDAEFK-biotin*), el anticuerpo anti-biotina marcado con terbio, tampón HEPES (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7,5), la disolución de parada (Tris 800 mM con 0,01% de NP-40, pH 8,0) y el tampón de acetato sódico (50 mM, pH 4,5) (suministrados en el kit para ensayo LanthaScreen TR-FRET BACE1, Invitrogen) y los derivados de cumarina seleccionados como representativos de las distintas series antes descritas (**Tablas 2-14**). Para su selección primero se partió de aquellas estructuras más sencillas de cada serie y, a partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron nuevas estructuras similares a las que resultaron activas pero con diferentes sustituyentes.

4.4.2. Preparación de las disoluciones de los compuestos y fármacos

Los nuevos derivados de cumarina, así como el inhibidor de referencia OM-99, se disolvieron en DMSO para preparar disoluciones stock (10 mM) que se mantuvieron, para su conservación, a -20 °C.

A partir de estas disoluciones stock se realizaron las adecuadas diluciones, empleando en este caso el tampón de acetato sódico (50 mM, pH 4,5) proporcionado en el kit y preparándolas en el mismo día de realización del experimento.

4.4.3. Determinación de la inhibición de la BACE1

Para estudiar los posibles efectos de nuestros compuestos y del inhibidor de referencia OM-99 sobre la actividad enzimática de BACE1, se utilizó un método basado en la técnica de TR-FRET (*Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer*)³⁹⁹.

La base de un ensayo TR-FRET es la de un ensayo FRET estándar: cuando un par adecuado de fluoróforos se aproximan el uno al otro, la excitación del primer fluoróforo (el donante) puede ser transferida al segundo fluoróforo (el aceptor). Esta transferencia de energía se detecta por un aumento en la emisión de fluorescencia del aceptor y una

disminución en el donante. Tras la escisión por la proteasa, el fluoróforo (donante) se separa del grupo aceptor, restaurándose el rendimiento de fluorescencia completa del donante. El aumento de fluorescencia está directamente relacionado con la tasa de proteólisis (**Figura 58**).

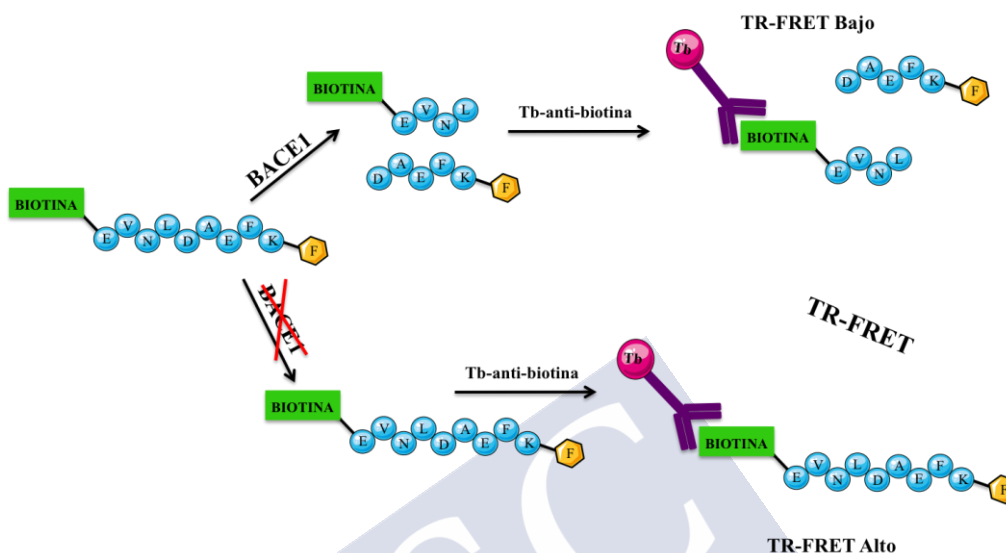


Figura 58. Esquema de la reacción catalizada por la BACE1

A diferencia de los ensayos FRET estándar, los ensayos TR-FRET utilizan como especie donante un quelato de lantánidos de larga duración. Los lantánidos son interesantes pues la vida útil en estado excitado (tiempo promedio que la molécula pasa en el estado excitado después de aceptar un fotón) suele ser del orden de milisegundos o superior, en contraposición con los fluoróforos comunes utilizados en ensayos FRET estándar en la que suele ser de nanosegundos. El terbio permite, en contraposición con el europio, utilizar fluoróforos comunes, como la fluoresceína, como aceptores.

Adicionalmente, para evitar posibles interferencias de fluorescencia de fondo o dispersión de la luz y de excitación directa, el TR-FRET también garantiza un retraso adecuado (de unos 50 a 100 microsegundos) después de la excitación.

La enzima BACE1 recombinante humana (77 U/mL stock) se diluyó en el tampón de acetato sódico pH 4,5.

Se tomaron 30 μ L de tampón de acetato sódico (50 mM, pH 4,5) conteniendo distintas concentraciones de los compuestos a estudiar (o el inhibidor de referencia), la

enzima BACE1 (2,1 U/mL) y el sustrato FL-BACE1-biotina (concentración final 200 nM) y se incubaron en placas de 96 pocillos negros de fondo plano (96-well Half Area Black Flat Bottom Polystyrene NBS Microplate, Corning®) a temperatura ambiente y protegidos de la luz durante 60 min.

Simultáneamente se llevaron a cabo experimentos control, sustituyendo los fármacos o inhibidores de referencia con las diluciones apropiadas de los vehículos.

Después del periodo de incubación, la reacción se detuvo añadiendo 10 μ L de la solución de parada (anticuerpo Tb-anti-biotina, concentración final 5 nM). Después de mezclar, la disolución se mantuvo 60 min a temperatura ambiente y protegida de la luz. Una vez finalizada la incubación se procedió a efectuar la lectura ($\lambda_{\text{excitación}}$ 545, $\lambda_{\text{emisión}}$ 585) mediante la técnica de TR-FRET en un lector de placa multifunción (CLARIOstar® Plus, BMG LABTECH, Offenburg, Alemania). Se determinó además la fluorescencia emitida por el sustrato FL-BACE1-Biotin a la misma concentración usada en los experimentos. El valor de la fluorescencia emitido en ausencia de la enzima se sustrajo a la señal de fluorescencia en presencia de la enzima.

4.4.4. Expresión de los resultados

La inhibición de la actividad β -secretasa se calculó a partir del porcentaje de la reacción control y los resultados se expresaron como % de inhibición con respecto a la actividad obtenida en la reacción control. Para los derivados de cumarina con mayor actividad inhibidora de BACE1, esta se expresó también como CI_{50} .

La actividad inhibidora de BACE1 de los nuevos derivados de cumarina y de los fármacos de referencia se expresó como CI_{50} , es decir, como la concentración de cada compuesto necesaria para producir una disminución del valor control de la actividad enzimática de las colinesterasas de un 50%. Los correspondiente valores de las CI_{50} fueron calculados utilizando el programa informático Origin™ 5.0, a partir de las ecuaciones de las rectas obtenidas por regresión lineal (métodos de mínimos cuadrados) de los puntos resultantes al representar el log de la concentración molar del compuesto estudiado (eje de abscisas) frente al porcentaje de inhibición de la actividad BACE1 control conseguido con las correspondientes concentraciones de cada compuesto (eje de ordenadas). Esta regresión lineal se realizó utilizando los datos obtenidos con 4-6

concentraciones de cada compuesto evaluado, capaces de inhibir la actividad control de las colinesterasas entre el 20% y el 80%. En los casos en los cuales los compuestos no alcanzaron un porcentaje de inhibición superior al 50-60%, los datos se expresaron como % de inhibición enzimática a concentración 100 μ M.

Salvo indicación contraria, los resultados mostrados en el texto y en las tablas están expresados como la media \pm error estándar de la media (e.e.m.) de 3 experimentos.



4.5. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE COX

4.5.1. Fármacos, reactivos y otros compuestos químicos

Los fármacos y compuestos químicos utilizados en los experimentos fueron el DMSO, la N,N,N',N'-tetrametil-*p*-fenilendiamina (TMPD), la hematina, el ácido araquidónico, la COX-2, la indometacina, el diclofenaco (adquiridos en Sigma-Aldrich, España) y los derivados de cumarina seleccionados de la serie de 3-fenilcumarina (**Tabla 2**) y todos los análogos híbridos cumarina-curcumina (**Tablas 12-14**).

La COX-1 se obtuvo mediante aislamiento a partir de unidades de *buffy coat*, gentilmente suministradas por el centro de transfusión de Galicia en virtud del acuerdo con la USC que se adjunta en el **Anexo I**, utilizando tampón fosfato (10 mM, pH 7,4 y 50 mM, pH 7,4).

4.5.2. Preparación de las disoluciones de los compuestos y fármacos y preparación de los tampones

Los nuevos derivados de cumarina, así como la indometacina y el diclofenaco (inhibidores de referencia) se disolvieron en DMSO para preparar disoluciones stock (10 mM) que se mantuvieron a -20 °C para su conservación.

A partir de estas disoluciones stock se realizaron las adecuadas diluciones, empleando también como disolvente DMSO, preparándolas en el mismo día de realización del experimento.

Para la elaboración del tampón Tris-HCl (100 mM, pH 8) se utilizó Trizma Base (adquirido en Sigma-Aldrich S.A.) y agua Milli-Q® ajustando a pH 8 la disolución obtenida.

Para la elaboración del tampón fosfato (10 mM, pH 7,4) se procedió a la preparación de dos disoluciones en agua Milli-Q®, NaH₂PO₄ (10 mM) y Na₂HPO₄ (10 mM). Una vez preparadas, sobre la disolución de Na₂HPO₄ se añadió, poco a poco y en constante agitación, la solución de NaH₂PO₄ hasta ajustar el pH en 7,4; este proceso puede requerir añadir de la solución de NaH₂PO₄ (10 mM) un volumen aproximadamente igual a la mitad del volumen de la solución de Na₂HPO₄ (10 mM).

Para la elaboración del tampón fosfato (50 mM, pH 7,4) se prepararon dos disoluciones en agua Milli-Q®, NaH₂PO₄ (50 mM) y Na₂HPO₄ (50 mM) y se siguió el mismo procedimiento descrito previamente.

Para la elaboración del tampón de lavado (pH 6), utilizado para el aislamiento del enzima COX-1 a partir de plaquetas de sangre humana, se procedió a preparar una disolución conteniendo NaCl 120 mM, KCl 5 mM, Na₃C₆H₅O₇ 12 mM, glucosa 10 mM y sacarosa 12,5 mM, diluidos en agua Milli-Q®. Posteriormente se ajustó la disolución preparada a pH 6.

4.5.3. Aislamiento de la enzima COX-1

Las unidades de *buffy coat* se diluyeron inicialmente en relación 1:1 en el tampón de lavado previamente preparado. Se llevó a cabo una primera centrifugación a 400 xg durante 8 minutos a 25 °C en una centrífuga Omnifuge 2.0 RS Heraeus Sepatech para obtener el plasma rico en plaquetas.

Posteriormente, se llevó a cabo una nueva centrifugación del plasma rico en plaquetas a 890 xg durante 20 minutos a 4 °C en una centrífuga Beckman Avanti J-26, rotor JA-20, tras la cual, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en tampón de lavado en un volumen similar al recuperado previamente, centrifugando nuevamente a 890 xg durante 20 minutos a 4 °C utilizando la misma centrífuga.

Tras desechar nuevamente el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en tampón fosfato (10 mM, pH 7,4). Las membranas celulares de las plaquetas se rompieron para liberar la COX-1 mediante el empleo de ultrasonidos, manteniendo la suspensión de plaquetas en baño de hielo, utilizando el sonicador Digital Sonifier 250 Branson, al 40% de amplitud de salida, durante 6 ciclos de 10 segundos, espaciando cada uno de los ciclos 50 segundos.

La suspensión obtenida se centrifugó, a 890 xg durante 20 minutos a 4 °C, en una centrífuga Beckman Avanti J-26, rotor JA-20, recuperando posteriormente el sobrenadante que se centrifugó, a 10.000 xg durante 10 minutos, en una centrífuga Optima L-100 XP, rotor 70 Ti Beckman Couter.

Posteriormente, tras recuperar nuevamente el sobrenadante, se pasó a centrifugar a 100.000 xg durante 60 minutos a 4 °C en una centrífuga Optima L-100 XP, rotor 70 Ti Beckman Coulter.

Una vez terminada la centrifugación, y tras descartar el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 1 mL de tampón fosfato (50 mM, pH 7,4).

Finalmente se llevó a cabo la cuantificación de proteínas totales mediante el método de Bradford. La disolución de COX-1 se conservó a -80 °C hasta su utilización⁴⁰⁰.

4.5.4. Determinación de la inhibición de la COX-1

Los potenciales efectos de los derivados de cumarina sobre la actividad de las isoformas de la COX (COX-1 y COX-2), se determinaron siguiendo un método cromogénico basado en la oxidación de TMPD durante la reducción de PGG2 a PGH2⁵¹⁷.

La formación de N,N,N',N'-tetrametil-1,4-fenilendiimino a partir de TMPD y ácido araquidónico, catalizado por las isoformas de la COX en presencia de hematina, pudo ser detectado espectrofotométricamente a λ 570 nm (**Figura 59**).

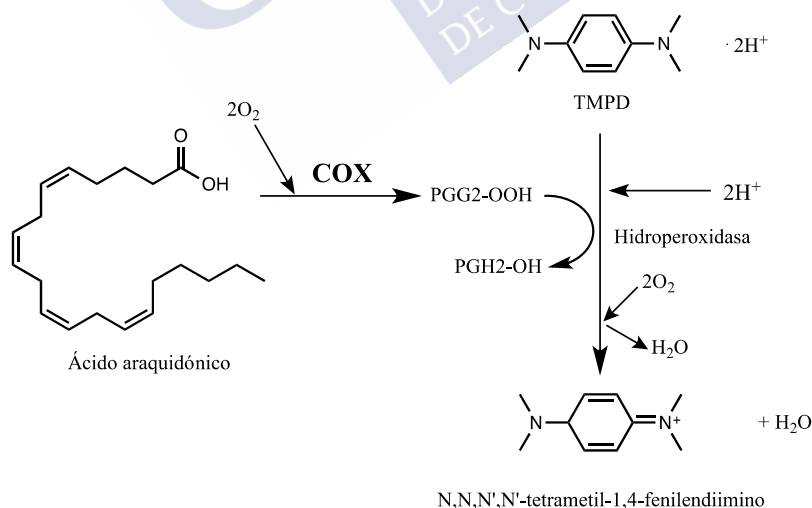


Figura 59. Esquema de la reacción catalizada por las isoformas de la COX

Una disolución de 100 μ L de tampón Tris-HCl (100 mM, pH 8) conteniendo hematina (0,1 mM) y TMPD (2 mM), diferentes concentraciones de los compuestos a

estudiar y COX-1 ó COX-2 (cantidades apropiadas para obtener bajo nuestras condiciones experimentales el mismo incremento de absorbancia del control: 0.08 U/min), se incubó a 37 °C durante 3 min en placas de 96 pocillos transparentes y de fondo plano Microtest™ 96 well assay plate, (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). Después del periodo de incubación, se comenzó la reacción al adicionar ácido araquidónico (300 µM).

La producción de N,N,N',N'-tetrametil-1,4-fenilenediimino fue cuantificada a 37 °C en un lector de absorbancia (Fluo-star Optima, BMG LABTECH, Offenburg, Alemania) determinando la absorbancia generada (λ 570 nm) durante 30 segundos, un periodo en el cual el incremento de absorbancia fue lineal desde el principio.

La disolución en ausencia de compuesto a estudiar o los fármacos de referencia permitió determinar el 100% de la actividad enzimática (control).

La absorbancia específica (utilizada para obtener los resultados finales) se calculó después de sustraer la absorbancia de fondo, determinada utilizando únicamente la absorbancia de los compuestos a estudiar en tampón Tris-HCl.

Además se determinó la posible capacidad de que los compuestos modificaran la absorbancia mediante una reacción enzimática con TMPD.

4.5.5. Expresión de los resultados

La inhibición de la actividad enzimática se expresó como % de la actividad del control. Para aquellos compuestos que presentaron mayor actividad se calculó la CI_{50} . Los correspondiente valores de las CI_{50} para cada compuesto fueron calculados, utilizando el programa informático Origin™ 5.0, a partir de las ecuaciones de las rectas obtenidas por regresión lineal (métodos de mínimos cuadrados) de los puntos resultantes al representar el log de la concentración molar del compuesto estudiado (eje de abscisas) frente al porcentaje de inhibición de la actividad de la COX control obtenido con las correspondientes concentraciones de cada compuesto (eje de ordenadas). Esta regresión lineal se realizó utilizando los datos obtenidos con 4-6 concentraciones de cada compuesto evaluado, capaces de inhibir la actividad control entre el 20% y el 80%. En los casos en los cuales los compuestos no alcanzaron un

porcentaje de inhibición superior al 50-60%, los datos se expresaron como % de inhibición enzimática a concentración 100 μ M.

Los resultados mostrados en el texto y en las tablas están expresados como la media \pm error estándar de la media (e.e.m.) de, al menos, n=3 experimentos.



4.6. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD SECUESTRADORA DE RADICALES LIBRES (DPPH[•])

4.6.1. Fármacos, reactivos y otros compuestos químicos

Los fármacos y compuestos químicos utilizados en los experimentos fueron el DMSO, el etanol, el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]), el ácido ascórbico (vitamina C) y algunos de los derivados de cumarina seleccionados en las distintas series estudiadas. Para llevar a cabo la selección se tuvo en cuenta la presencia de grupos hidroxilo o heteroarilo en la estructura.

4.6.2. Preparación de las diluciones de los compuestos y fármacos

Los compuestos a estudiar se disolvieron en DMSO para preparar disoluciones stock de concentración 10 mM que se mantuvieron a -20 °C para su conservación. El ácido ascórbico, utilizado como fármaco de referencia, fue disuelto en etanol para obtener una disolución stock (10 mM), que fue preparada cada día de realización de los experimentos.

A partir de estas disoluciones stock se realizaron las adecuadas diluciones, empleando también como disolvente DMSO o etanol según el caso, preparándolas en el mismo día de realización del experimento.

El radical libre DPPH[•] se preparó a concentración 50 µM en etanol.

4.6.3. Determinación de la actividad secuestradora de radicales libres

Para determinar la capacidad de los compuestos estudiados de neutralizar radicales libres se siguió un método espectrofotométrico basado en la decoloración del radical DPPH[•].

Debido a la fotosensibilidad del radical libre DPPH[•] y de algunos de los compuestos a estudiar, los experimentos fueron realizados evitando la exposición directa a la luz.

El DPPH[•] es un radical libre estable que presenta una intensa coloración violeta y que absorbe radiación a λ 515 nm, de forma que una disminución de la absorbancia se traduce en una disminución de la concentración del mismo, debido a la cesión de átomos de hidrógeno por la especie antioxidante (**Figura 60**).

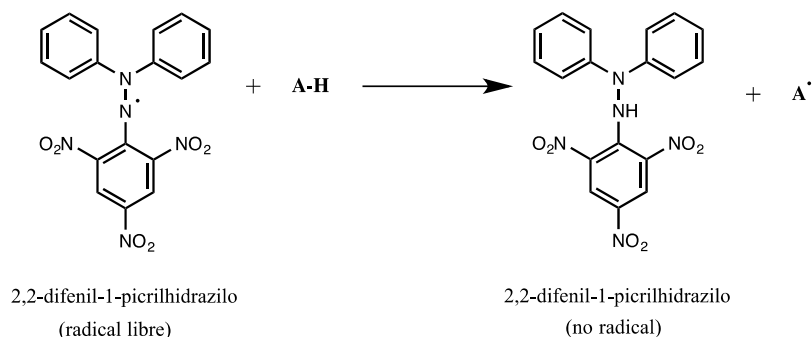


Figura 60. Reacción química entre el radical DPPH[•] y la especie antioxidante

Se añadieron 2 μ L de las disoluciones en DMSO, de distinta concentración, de los derivados de cumarina sobre 98 μ L de etanol. Posteriormente, en oscuridad, se añadieron 100 μ L de una solución de DPPH[•] a concentración de 50 μ M. La mezcla se agitó y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min en placas de 96 pocillos transparentes y de fondo plano Microtest™ 96 well assay plate, (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). Transcurrido ese tiempo se determinó la absorbancia de la mezcla a λ 517 nm en un lector de placa (Fluo-star Optima, BMG LABTECH). Se determinó además la absorbancia del radical libre DPPH[•] en ausencia de los derivados de cumarina o la vitamina C⁴⁰¹.

En los experimentos control, la disolución del compuesto fue sustituida por una dilución adecuada del vehículo empleado (DMSO) y se observó que este no presentaba un efecto significativo.

4.6.4. Expresión de los resultados y representación gráfica

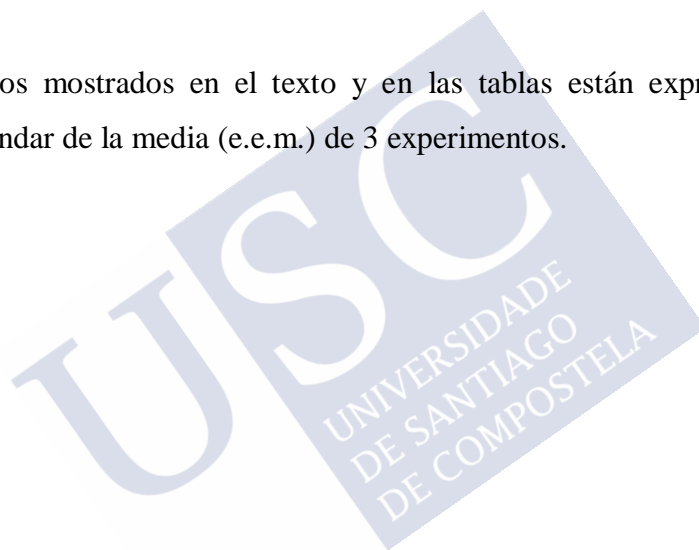
La actividad secuestradora de radicales libres se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ actividad secuestradora} = [(\Delta_{\text{DPPH}^\bullet} - \Delta_{\text{muestra}}) / \Delta_{\text{DPPH}^\bullet}] \times 100.$$

En los gráficos de barras se representan los nuevos compuestos estudiados y la vitamina C en el eje de abscisas y su porcentaje de captación de radicales libres a concentración 100 μ M en el eje de ordenadas. Para las representaciones gráficas se utilizó el programa Graphpad Prism® (v 6.0) (San Diego, USA).

Para los derivados de cumarina con mayor actividad secuestradora de radicales libres, se calculó también su CE_{50} es decir, la concentración de cada compuesto necesaria para neutralizar el 50% de los radicales de DPPH[•]. Los correspondientes valores de las CE_{50} para cada compuesto fueron calculados, utilizando el programa informático OriginTM 5.0, a partir de las ecuaciones de las rectas obtenidas por regresión lineal (métodos de mínimos cuadrados) de los puntos resultantes al representar el log de la concentración molar del compuesto estudiado (eje de abscisas) frente al porcentaje de actividad secuestradora de radicales libres control obtenido con las correspondientes concentraciones de cada compuesto (eje de ordenadas). Esta regresión lineal se realizó utilizando los datos obtenidos con 4-6 concentraciones de cada compuesto evaluado, capaces de neutralizar entre el 20% y el 80% de los radicales de DPPH[•].

Los resultados mostrados en el texto y en las tablas están expresados como la media \pm error estándar de la media (e.e.m.) de 3 experimentos.



4.7. CULTIVOS CELULARES

4.7.1. Cultivo primario de neuronas de corteza motora

Para la obtención de los cultivos se emplearon fetos de 19 días de gestación de ratas albinas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar-Kyoto, suministradas por la empresa Criffa S.A. (Barcelona, España) que se crían y mantienen en el Animalario del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la USC, REGA núm. ES150780263501.

Estos animales se disponen de forma individual en jaulas 215x465x145 mm (Panlab) con lechos de viruta de álamo (Lignocel®, J. Rettenmaier & Söhne) en una habitación perfectamente limpia, iluminada desde las 08:00 hasta las 20:00 h (ciclo de 12 h de luz: 12 h de oscuridad), termostatizada a 22-24 °C y con control de la humedad ambiental (45-65%). Los animales tuvieron libre acceso a los gránulos de pienso (SAFE: Scientific Animal Food & Engineering) y al agua de bebida.

El protocolo experimental, asociado al procedimiento informado con Núm. Registro Entrada 15007DE/12/INVMED02/NERV02/B/MCT3 (Xunta de Galicia), ha sido aprobado por el comité de bioética de la USC. El sacrificio de los animales ha sido llevado a cabo de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos; y el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia y la Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio elaborado por AAALAC International (*Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International*, Asociación internacional para la evaluación y acreditación de cuidado de animales de laboratorio).

Una vez sacrificada la madre mediante la inhalación de dióxido de carbono (CO₂) suministrado durante un período de 2-3 minutos, los fetos se obtuvieron por cesárea, para diseccionar cuidadosamente sus cerebros. Una vez retiradas las meninges, se extrajo la corteza motora. Tras la digestión mecánica del tejido, las células se suspendieron en medio Neurobasal suplementado con B-27 (50X; 2%), L-glutamina 0,5 mM y con la combinación de penicilina G y estreptomicina sulfato (1%)

(Gibco/Invitrogen S.A.). Las células se sembraron a una densidad de 2×10^5 cél/mL en placas de 96 pocillos estériles (Microtest™ 96 well assay plate, BD Biosciences), previamente tratadas con poli-*D*-lisina (Gibco/Invitrogen S.A) para favorecer su adhesión. Las placas de 96 pocillos, tratadas con poli-*D*-lisina se incubaron a 37 °C durante dos horas y posteriormente se lavaron 3 veces con PBS (NaCl 140 mM; KH₂PO₄ 2 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KCl 2,7 mM) antes de su utilización.

Durante la fase de crecimiento, las células se mantuvieron en un incubador (Forma Direct Heat CO₂, Thermo Electron Corporation) en condiciones de humedad saturada con una presión parcial de CO₂ del 5% y a 37 °C, durante 7 días hasta que al microscopio se pudo observar una densa red neuronal²³¹ (**Figura 61**).

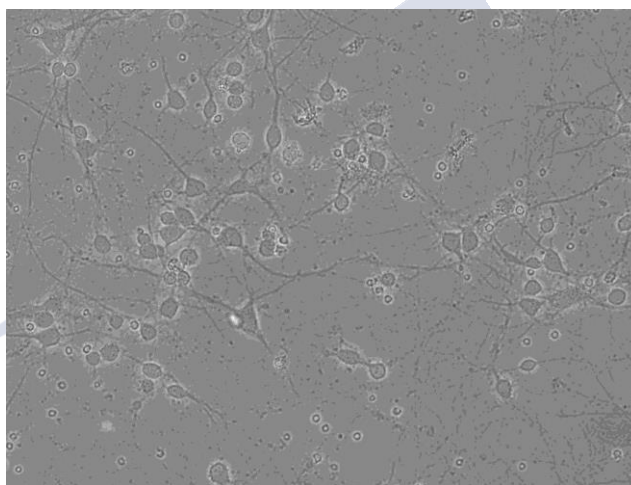


Figura 61. Cultivo primario de neuronas de corteza motora (microscopio CKX31 Olympus, 40X)

4.7.2. Cultivo de células SH-SY5Y

La línea celular SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™, American Type Culture Collection, Virginia, US) deriva de neuroblastoma humano y representa un buen modelo de neuronas inmaduras humanas, capaces de diferenciación celular⁴⁰².

El medio de cultivo para las células SH-SY5Y fue una mezcla a partes iguales de *Nutrient Mixture F-12 Ham* (Ham's F12) y *Minimum Essential Medium Eagle* (EMEM) (Sigma-Aldrich S.A.), suplementado con FBS (15%), L-Glutamina (1%), aminoácidos no esenciales (1%) y la combinación de penicilina G y estreptomicina sulfato (1%) (Gibco/Invitrogen S.A.).

Las células se cultivaron en flask de 75 cm² en un incubador (Forma Direct Heat CO₂, Thermo Electron Corporation) en condiciones de humedad saturada con una presión parcial de CO₂ del 5% y a 37 °C, hasta alcanzar la confluencia (90-95%) de la superficie del flask (**Figura 62**).

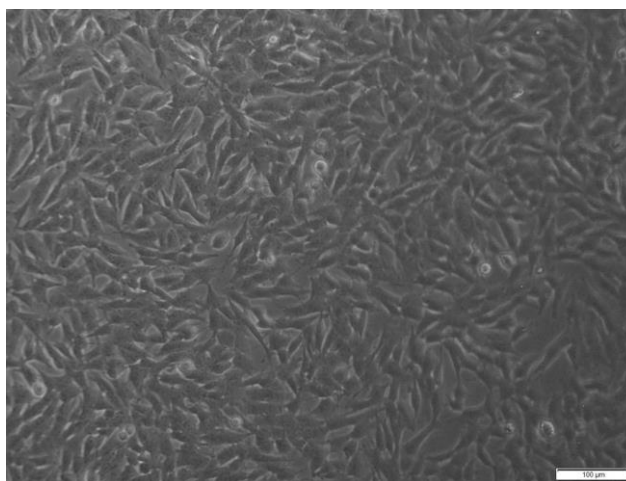


Figura 62. Cultivo de células SH-SY5Y (Confocal Laser Scanning Microscopy (Leica SP5)).

Posteriormente, se realizaron subcultivos a una superficie 3 veces mayor. Para ello, se aspiró el medio de cultivo y se trataron las células con una solución de tripsina-EDTA 0,05%) (Sigma-Aldrich S.A.) durante 5 min a 37 °C. Tras comprobar la proteólisis de la matriz extracelular, la suspensión resultante se diluyó 1:1 en medio de cultivo y se centrifugó a 100 xg durante 5 min a 20-22 °C. El pellet obtenido se resuspendió en el medio de cultivo completo y se sembró en nuevos flask de 75 cm².

Para la realización de los experimentos, las células se sembraron en placas estériles de 96 pocillos (Microtest™ 96 well assay plate, BD Biosciences.) a una densidad celular de 1x10⁵ cél/mL y crecieron, distribuidas en alícuotas de 100 μL, durante 24 h en las mismas condiciones anteriormente descritas.

4.7.3. Determinación de la viabilidad celular

Se evaluó, en primer lugar, la actividad neurotóxica de los nuevos derivados de cumarina sobre células SH-SY5Y y neuronas de cultivo primario de corteza motora cultivadas como se describió previamente.

Los cultivos se trataron con los compuestos objeto de estudio disueltos en DMSO a distintas concentraciones (concentración final de DMSO 1%). Una vez tratadas las células, se incubaron durante 24 h.

Además, los análogos híbridos cumarina-curcumina **H1i2**, **H1K5**, **H1J4** fueron formulados en nanopartículas biodegradables por el grupo del Dr. Francisco Otero del Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la USC. Para su evaluación, se prepararon las correspondientes diluciones en medio de cultivo y, una vez tratadas las células, se realizó la incubación durante 72h, tiempo necesario para la liberación de las moléculas.

La actividad neuroprotectora de los nuevos derivados de cumarina, se evaluó tanto sobre neuronas de cultivo primario como en las células de línea SH-SY5Y. Los cultivos se trataron con los compuestos objeto de estudio disueltos en DMSO a distintas concentraciones (concentración final de DMSO 1%) y, a continuación, con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (100 μ M) (utilizado como agente neurotóxico), incubándose durante 24 h.

Transcurrido el periodo de incubación, se determinó la viabilidad de las células para estudiar el posible efecto neurotóxico o neuroprotector frente a un agente pro-oxidante (H_2O_2), utilizando el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) (Sigma-Aldrich S.A.). El MTT es reducido a formazán por las mitocondrias de las células viables⁴⁰³ (**Figura 63**)

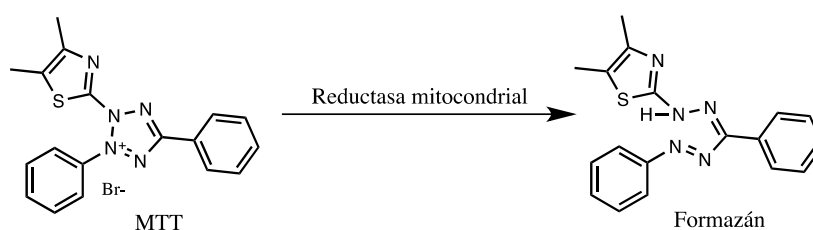


Figura 63. Reacción de reducción de MTT a formazán

Se añadieron 10 μ L de MTT (5 mg/mL en tampón Hanks) a cada pocillo conteniendo 100 μ L de medio. Tras incubar dos horas a 37 °C, se retiró el medio y los cristales de formazán formados se resuspendieron en 100 μ L/pocillo de DMSO. La producción de formazán por las células viables fue cuantificada a 37 °C en un lector de

absorbancia (Fluo-star Optima, BMG LABTECH) determinando la absorbancia generada (λ 570 nm).

4.7.4. Expresión de los resultados, representación gráfica y análisis estadístico

Los resultados se expresan como el porcentaje de viabilidad de los cultivos neuronales o cultivos de células SH-SY5Y tratados con los compuestos objeto de estudio respecto a aquellos utilizados como control.

El porcentaje de viabilidad celular se obtiene utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilidad} = \Delta_{\text{células tratadas}} / \Delta_{\text{control}} \times 100$$

Las células tratadas con DMSO (1%), vehículo en el que se han disuelto los derivados de cumarina, fueron usadas como control.

El porcentaje de viabilidad representa la media \pm error estándar de la media (e.e.m.) de al menos 5 experimentos. Para las representaciones gráficas y el análisis estadístico se utilizó el programa Graphpad Prism[®] (v 6.0) (San Diego, USA).

En los gráficos de barras se representan los distintos compuestos estudiados en el eje de abscisas y la viabilidad celular correspondiente a su concentración a 10 μ M en el eje de ordenadas. Cada ensayo fue realizado por triplicado y el número mínimo de experimentos fue de 5 (n=5). Los análogos híbridos cumarina-curcumina formulados como nanopartículas biodegradables se estudiaron a concentraciones de 1 μ M, 100 nM y 10 nM.

4.8. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ERO

4.8.1. Fármacos, reactivos y otros compuestos químicos

Se seleccionaron los derivados de cumarina **SMA1**, **JLG5b**, **MJM471** y **CUM71**. Estos compuestos han mostrado un efecto neuroprotector frente a H_2O_2 y actividad inhibidora de MAO, BACE1 o COX. El plumbagin (Sigma-Aldrich S.A.) fue utilizado como fármaco de referencia. Para la realización de los experimentos se utilizó la sonda diacetato de 5(6)-carboxi-2,7-diclorofluoresceína (cDCFDA) (Fluka Analytical S.A.).

4.8.2. Preparación de las diluciones de los compuestos y fármacos

Inicialmente, se preparó una disolución stock de la sonda c-DCFDA en DMSO (concentración 5 mM) que se diluyó 1:10 en medio Hank's.

A partir de las disoluciones stock de los derivados de cumarina se prepararon diluciones de concentración 1 mM en DMSO. El inhibidor de referencia plumbagin, con capacidad para inhibir la producción de ERO vía NADPH oxidasas, se disolvió en DMSO para obtener una disolución de concentración 1 mM. El H_2O_2 utilizado como agente pro-oxidante se preparó a concentración de 10 mM.

4.8.3. Medición de ERO intracelular

Las células SH-SY5Y cultivadas en placas negras de 96 pocillos de fondo transparente y plano (Corning® 96 Well Black Polystyrene Microplate, Costar) como se indicó previamente, se trataron con los compuestos objeto de estudio o plumbagin (concentración 10 μ M, concentración final de DMSO 1%) durante 24 h en condiciones estándar (37 °C, 5% CO_2).

Transcurridas las 24 h, se retiró el medio y las células se lavaron con PBS. Se añadieron 100 μ L de medio con la sonda cDCFDA (5 μ M) y se incubaron nuevamente las células durante 30 min en condiciones estándar (37 °C, 5% CO_2).

Transcurrido este tiempo, se retiró el medio que contenía la sonda y las células se lavaron con PBS. Se añadieron 100 μ L de Hank's en cada pocillo y las células se trataron nuevamente con los derivados de cumarina seleccionados o plumbagin (concentración 10 μ M). A continuación, se añadió H_2O_2 como agente pro-oxidante e, inmediatamente después, se determinó el incremento de fluorescencia producido

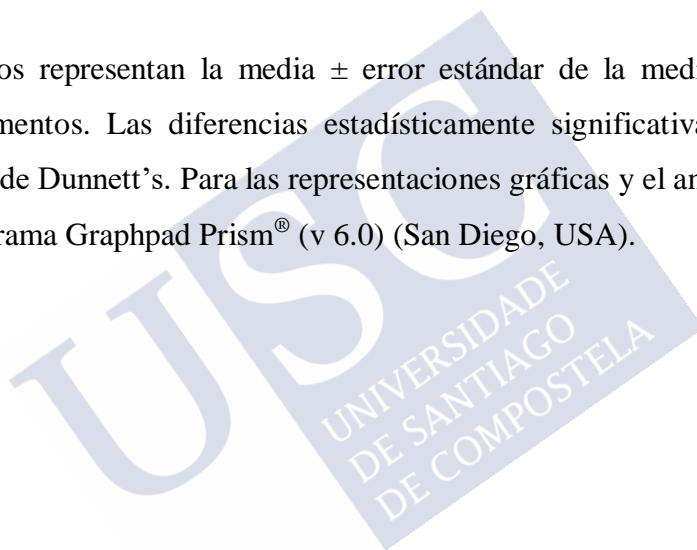
durante un período de 2 h en intervalos de 5 min ($\lambda_{\text{excitación}}$ 485 nm, $\lambda_{\text{emisión}}$ 520 nm) a 37 °C en un lector de fluorescencia de placa (Fluo-star Optima™, BMG LABTECH)⁴⁰⁴.

4.8.4. Expresión de los resultados, representación gráfica y análisis estadístico

Las ERO se determinaron calculando el área bajo la curva (ABC) obtenida al representar la fluorescencia generada (eje Y) frente al tiempo (eje X) para los distintos tratamientos. Cada experimento fue realizado por duplicado.

En el gráfico de barras se representaron en el eje de abscisas los distintos grupos de tratamiento y en el eje de ordenadas el porcentaje del ABC para cada uno de los grupos frente al ABC correspondiente al control (100%).

Los resultados representan la media \pm error estándar de la media (e.e.m.) de al menos 3 experimentos. Las diferencias estadísticamente significativas se calcularon utilizando el test de Dunnett's. Para las representaciones gráficas y el análisis estadístico se utilizó el programa Graphpad Prism® (v 6.0) (San Diego, USA).



4.9. AMPLIFICACIÓN POR RETROTRANSCRIPCIÓN-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

4.9.1. Fármacos, reactivos, otros compuestos químicos e iniciadores

Los fármacos, reactivos y otros compuestos químicos utilizados en los experimentos fueron el DMSO, el cloroformo (CHCl_3), el isopropanol, el dietilpircarbonato (DEPC), el etanol, la PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (adquiridos en Sigma-Aldrich S.A.), el NZYol, el random hexamer mix (RHM), los dNTPs (deoxinucleósidos trifosfatos, mezcla de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), el inhibidor de ribonucleasa (*NZY Ribonuclease Inhibitor*) y la transcriptasa reversa (*NZY M_MuLV Reverse Transcriptase*) (adquiridos en NZYTech), los iniciadores (sentido y anti-sentido) previamente diseñados de Casp3, Nrf2, TNF- α y NF- κ B (adquiridos en Invitrogen, Thermo Fisher). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se recogen en la **Tabla 15**. Los derivados de cumarina seleccionados fueron los compuestos **SMA1** y **JLG5b**. Como ya se señaló previamente, estos dos derivados híbridos resveratrol-cumarina han mostrado un efecto neuroprotector frente a H_2O_2 tanto en neuronas como en células SH-SY5Y, capacidad de neutralizar especies reactivas de oxígeno y actividad inhibidora de MAO o COX.

Tabla 15. Temperaturas óptimas y secuencias de los iniciadores utilizados en la RT-qPCR.

CEBADORES	TEMPERATURA ÓPTIMA (°C)	SECUENCIAS SENTIDO: 5'→3' (F) Y ANTI-SENTIDO: 3'→5' (R)
β -ACTINA	60,5	F: GGA CTT CGA GCA AGAGAT GG R: AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG
CAPS3	57,4	F: TTT TTC AGA GGG GAT CGT TG R: CGG CCT CCA CTG GTA TTT TA
NF- κ B	58,4	F: CCT GGA TGA CTC TTG GGA AA R: TCA GCC AGC TGT TTC ATG TC
NRF2	59,4	F: GCG ACG GAA AGA GTA TGA GC R: GTT GGC AGA TCC ACT GGT TT
TNF- α	62,5	F: CAG AGG GCC TGT ACC TCA TC R: GGA AGA CCC CTC CCA GAT AG

Todo el material que se utilizó fue certificado libre de ARNasas y ADNasas, pues es el más adecuado para manejar las muestras de ARN.

4.9.2. Preparación de los reactivos de PCR

El agua DEPC se preparó diluyendo 1 mL de DEPC en 1L de agua Milli-Q® estéril, (concentración final 0,1%). Tras una noche en agitación, se introdujeron dos veces en el autoclave (120 °C, 20-30 min) para eliminar el DEPC restante, pues produce modificaciones químicas que degradan el RNA pero se elimina con facilidad en las condiciones de autoclave.

La mezcla aleatoria de hexámero (RHM) se preparó a partir de una solución stock de 50 ng/μL, ajustando la concentración a 1,6 ng/μL utilizando agua DEPC.

La mezcla de los dNTPs de concentración 10 mM se preparó en agua DEPC a partir de las correspondientes disoluciones de dATP, dGTP, dCTP y dTTP (100 mM).

Los iniciadores utilizados se ajustaron a una concentración stock de 100 μM en agua Milli-Q® estéril, siendo la concentración final del experimento de 300 nM.

4.9.3. Extracción de ARN, transformación a ADNc y RT-qPCR

Las células de línea SH-SY5Y se sembraron en placas de 6 pocillos, a una densidad de 1×10^5 cél/mL y se dejaron crecer, en un incubador (Forma Direct Heat CO₂, Thermo Electron Corporation), hasta cubrir aproximadamente el 80% de la superficie del pocillo. Las células se trataron entonces con los compuestos objeto de estudio a una concentración final de 10 μM y con H₂O₂ (100 μM) o con ambos y se incubaron durante 24 h.

Para la extracción del ARN, se retiró, en primer lugar, el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS frío. Se colocaron las placas sobre hielo y se añadió el reactivo NZYol (600 μL/pocillo) para la extracción de ARN, lisando las células mediante el raspado de los pocillos y pipeteo repetido.

Cada muestra homogeneizada se trasvasó a un vial y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente para la completa disociación del complejo núcleo-proteico. Posteriormente, se añadieron 120 μL de CHCl₃ a cada vial (200 μL/1000 μL de NZYol). Estos se agitaron por inversión durante 15 segundos y se mantuvieron posteriormente 3 minutos a temperatura ambiente (20-22 °C).

Las soluciones obtenidas se centrifugaron a 15.700 xg, 15 minutos, a 4 °C, en una centrífuga Eppendorf 5415 R previamente pre-enfriada, observándose tras la centrifugación, tres fases claramente diferenciadas.



Fase superior: Ácidos nucleicos (ARN)

Fase intermedia: Proteínas y ADN

Fase inferior: NZYol + cloroformo

Se recuperó la fase superior y se diluyó con 300 μ L de isopropanol (500 μ L de isopropanol/1000 μ L de NZYol utilizado inicialmente para la extracción). Las soluciones obtenidas se agitaron por inversión durante 15 segundos y posteriormente se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Por último, se centrifugaron nuevamente en las condiciones previamente descritas.

Tras la centrifugación se retiró el sobrenadante por volcado, resuspendiéndose el pellet en 600 μ L de etanol 75% (en H₂O DEPC).

Las muestras se centrifugaron nuevamente, bajo las mismas condiciones durante 10 minutos. Se retiró el etanol y se dejaron secar al aire durante 10 minutos. A continuación, el pellet se resuspendió en 12 μ L de H₂O DEPC y se calentó a 60 °C durante 10 minutos para, posteriormente, medir la concentración y pureza de las muestras (relación de absorbancias a λ 260/280 y λ 260/230 nm), con el programa NanoDrop en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Estas muestras se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

Una vez cuantificado el ARN de las muestras, se llevó a cabo la transformación de ARN a ADNc. Para ello, se ajustó la cantidad de ARN en cada muestra a 1,5 μ g y se trataron con 1 μ L del RHM (1,6 ng/ μ L) y 1 μ L de una mezcla de dATP, dCTP, dGTP, dTTP (mezcla de dNTPs) a concentración final de 0,5 mM completando con agua DEPC hasta un volumen final de 16 μ L. Se utilizó un programa estandarizado en el

termociclador SureCycler8800 (Agilent Technologies®) manteniendo las muestras a 65°C durante 5 minutos.

Posteriormente se añadió 1 µL de inhibidor de ribonucleasa (*NZY Ribonuclease Inhibitor*), 1 µL de la transcriptasa reversa (*NZY M_MuLV Reverse Transcriptase*) y 2 µL del tampón de reacción (10X, 500 mM Tris-HCl, 750 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 100 mM DTT, pH 8,3). Nuevamente en el termociclador, se llevó a cabo un proceso en tres fases: primero se incubaron 10 minutos a 25 °C, posteriormente 50 minutos a 37 °C y por último 15 minutos a 70 °C. Las muestras de ADNc obtenidas se conservaron a -20 °C hasta su empleo.

La q-PCR se llevó a cabo en placas de 96 pocillos (4titude) utilizando el SYBR Green Master Mix, los iniciadores previamente seleccionados y diseñados y el ADNc obtenido a partir del ARN extraído de los cultivos celulares. La Master Mix conteniendo cada uno de los iniciadores, se preparó en hielo, protegida de la luz, utilizando 10 µL de 2X SYBR Green (concentración final 1X), 1,2 µL de la mezcla de los iniciadores sentido y anti-sentido a concentración final 300 nM y se completó con agua hasta un volumen final de 18 µL.

En cada pocillo, se añadieron 2 µL del ADNc y 18 µL de la Master Mix correspondiente, preparada como se indicó anteriormente. Las placas se sellaron con un papel (4titude) utilizando una selladora de placas (HT121TS, Rainin). El contenido de cada pocillo se homogeneizó utilizando un spin de placa y se inició la RT q-PCR (**Figura 64**) con el Mastercycler® ep realplex (Eppendorf) utilizando el programa realplex⁴⁰⁵. La secuencia utilizada fue la siguiente:

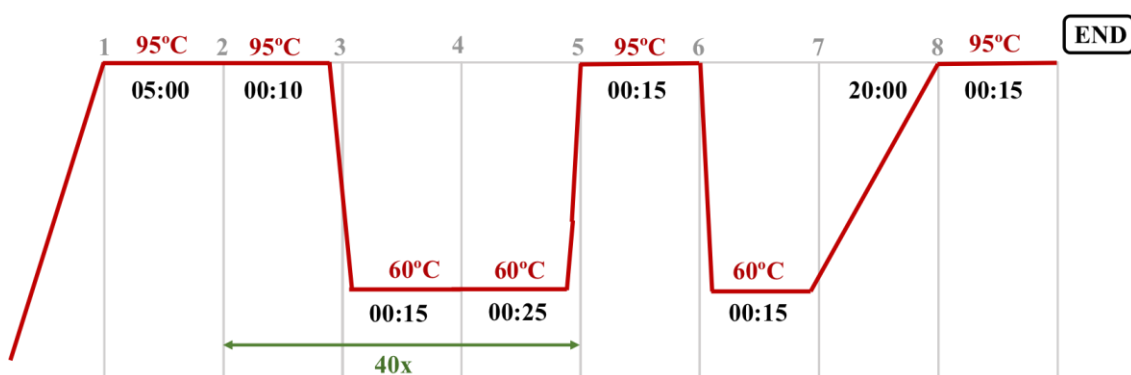


Figura 64. Esquema de RT q-PCR

4.9.4. Expresión de los resultados, representación gráfica y análisis estadístico

Salvo indicación contraria, los resultados mostrados en el texto y en las tablas están expresados como la media \pm error estándar de la media (e.e.m.) de, al menos, 3 experimentos.

El análisis cuantitativo de la expresión génica se llevó a cabo en base al valor de ciclo umbral (C_T). Este valor se obtiene al analizar la curva de amplificación de la PCR donde se representa la fluorescencia obtenida en cada ciclo de PCR y se define como el ciclo en el cual la intensidad de la emisión del marcador fluorescente se eleva por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción de la PCR.

Para determinar los cambios en la expresión génica inducidos por H_2O_2 , se empleó el método de la expresión relativa $2^{-\Delta\Delta C_T}$

$$\Delta C_T = C_T \text{ gen diana} - C_T \text{ gen referencia}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ muestra tratada con } H_2O_2 - \Delta C_T \text{ muestra sin tratar con } H_2O_2.$$

Como gen de referencia se empleó β -actina ya que su expresión no se vio modificada tras la exposición a H_2O_2 .

Los datos se expresaron como nivel de cambio respecto al correspondiente control. Para las representaciones gráficas y el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism® (v 6.0) (San Diego, USA).

4.10. CÁLCULO TEÓRICO DE PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y PASO A TRAVÉS DE BHE

Para la predicción teórica de paso a través de membranas biológicas se utilizaron los programas informáticos ChemDraw (PerkinElmer), para representar las estructuras, y MolInspiration (<http://www.molinspiration.com/>), utilizando la opción “*Calculation of Molecular Properties and Prediction of Bioactivity*” para obtener una evaluación teórica de sus propiedades fisicoquímicas.

Este programa permite calcular parámetros como la lipofilia (expresada como Log P), el peso molecular (PM), el área de superficie polar topológica (TPSA), el número de dadores de enlaces de hidrógeno (nOHNH), el número de aceptores de hidrógeno (nOH) y el volumen molecular.

Desde hace años, se trabaja con la denominada regla de los 5 o regla de Lipinski en la que se recogen una serie de propiedades comunes a todas aquellas moléculas que presentan buenas propiedades de solubilidad y permeabilidad^{406,407}:

- **Peso molecular.** En general se recomienda que las moléculas posean un peso molecular inferior a 500 Da para que presenten buenas propiedades moleculares para su absorción.
- La **lipofilia** de las moléculas es un descriptor fisicoquímico de gran importancia, ya que es una medida de la tendencia relativa que tiene un soluto para preferir un entorno no acuoso frente a uno acuoso y nos permite predecir la mayor o menor facilidad que puede tener para atravesar membranas celulares. Es una característica decisiva para que un fármaco se absorba, distribuya y elimine. También es decisiva para la unión con su diana farmacológica, ya que los enlaces hidrofóbicos que se producen tras la desolvatación de ambas entidades constituyen la primera interacción fármaco-receptor antes de establecerse otras interacciones polares. Se define logP como el coeficiente de reparto de una especie única entre dos fases en equilibrio, una oleosa y acuosa. La recomendación es que el log P sea inferior a 5.

- ***Dadores de enlaces de hidrógeno.*** Se considera como tal cualquier heteroátomo con al menos un hidrógeno unido. Se recomienda que la molécula no tenga más de 5 donadores de enlaces de H.
- ***Aceptores de enlaces de hidrógeno.*** Se considera como tal cualquier heteroátomo sin una carga positiva formal, excluyendo halógenos, grupos pirrol, nitrógeno, oxígeno y azufre heteroaromáticos, y estados de oxidación más altos de nitrógeno, fósforo, y azufre, pero incluyendo los oxígenos unidos a ellos. Se recomienda que la molécula no tenga más de 10 aceptores de enlaces de hidrógeno.

Adicionalmente, se usó el programa de predicción CBLigand-BBB. Este predictor se construyó aplicando la máquina de vectores de soporte y los algoritmos LICABEPS en 4 tipos de huellas dactilares de 1593 compuestos. El programa proporciona una puntuación predictoria mayor que 0 si el compuesto analizado puede atravesar la BHE.

Sin embargo, no podemos olvidar que todos los resultados obtenidos a través de los programas MolInspiration y CBLigand-BBB no dejan de ser resultados teóricos, que nos permiten una aproximación a lo que puede ocurrir en la realidad, pero nunca serán definitivos para conocer la capacidad de paso a través de membranas biológicas de las nuevas estructuras a analizar.

4.11. ESTUDIO *IN VITRO* DE LA CAPACIDAD DE PASO A TRAVÉS DE LA BHE

4.11.1. Fármacos, reactivos y compuestos químicos

Los fármacos y compuestos químicos utilizados en los experimentos fueron hidrocortisona, desipramina, promazina, aldosterona, cafeína, ofloxacino, corticosterona, imipramina, testosterona, verapamilo, piroxicam (adquiridos en Sigma-Aldrich, Acros y Fluka, España) utilizados como fármacos de referencia y el extracto lipídico de cerebro porcino (PBL), empleado para simular la barrera biológica, que es comercializado por la casa Avanti Polar Lipids. Los compuestos objeto de estudio fueron, en este caso, **CUM11, CUM21, CUM21C, CUM41, CUM71, CUM81, CUM91, MJM223, MJM229, MJM247, MJM252, MJM257, MJM258**, ya descritos.

4.11.2. Determinación de paso a través de BHE

Para predecir la capacidad de paso a través de BHE, se utilizó la metodología de membranas artificiales paralelas (PAMPA: *Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*), un método de alta eficacia, rendimiento y reproducibilidad⁴⁰⁸ optimizado para moléculas con solubilidad acuosa limitada⁴⁰⁹.

Para realizar los experimentos se utilizaron filtros Millex con una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF), de 25 mm de diámetro y un tamaño de poro de 0,45 μm (Millipore Ibérica S.A.), que fueron empleados para filtrar las muestras. También, se utilizó una microplaca donadora de 96 pocillos que contiene un filtro de PVDF con un tamaño de poro 0,45 μm y una microplaca aceptora de 96 pocillos que tienen forma de lágrima (MultiScreen® IP Sterite Plate).

Los compuestos objeto de estudio se disolvieron en PBS/EtOH (70:30) a concentración final de 100 $\mu\text{g/mL}$ y se filtraron a través de un filtro de membrana Millex.

A cada pocillo de la placa aceptora se añadieron 200 μL de una disolución de PBS/EtOH (70:30).

La placa donadora fue impregnada con 5 μL de una disolución de lípidos de cerebro porcino disueltos en dodecano (20 mg/mL). Transcurridos 5 minutos, se añadieron 200 μL de la disolución de cada compuesto sobre esta placa. A continuación, la placa

donadora se puso sobre la aceptora formando una especie de “sándwich” y se dejaron en reposo durante 120 minutos a 25 °C.

Transcurrido este tiempo, se retiró cuidadosamente la placa donadora. La concentración de los compuestos objeto de estudio en los pocillos de la placa aceptora se determinó, previo paso de 130 μ L de la disolución de la placa aceptora a una placa de 96 pocillos transparente, utilizando un lector de absorbancia de UV.

Cada muestra fue analizada a 5 longitudes de onda diferentes, previamente seleccionadas para cada compuesto, en 4 pocillos y en 3 experimentos independientes como mínimo. Con el fin de validar el método en cada experimento se utilizaron los fármacos de referencia indicados en el apartado **4.11.1** cuyo grado de penetración en el SNC es conocido.

4.11.3. Expresión de los resultados

La permeabilidad efectiva (Pe) de los compuestos fue calculada usando el programa PSR4p (pION Inc.). Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes.

4.12. ESTUDIO *IN VIVO*

4.12.1. Animales

Para la realización de los experimentos *in vivo* se utilizaron ratones albinos machos Charles River “CD1-Swiss” con un peso de 25 ± 5 gramos. Los animales fueron suministrados por la Unidad de Producción Animal (Animalario Central) de la Universidade de Santiago de Compostela. El número mínimo de animales que se utilizó en cada experimento fue de 8 (n=8).

Los experimentos se llevaron a cabo en las instalaciones del Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, concretamente, en el laboratorio de Farmacología del sistema nervioso central, asociado al Animalario de la Facultad de Farmacia, REGA núm. ES150780263501. Los protocolos experimentales seguidos han sido aprobados por el comité de bioética de la USC y están asociados a los procedimientos informados con Núm. Registro Entrada 15007AE/09/INV MED 02/NER 02/JAFG4, 15007AE/09/INV MED 02/NER 02/JAFG13 y 15007AE/12/FUN01FARM03/MRLF1, Xunta de Galicia.

Los ratones se estabularon en grupos de 4 o de 8 animales, en cajas de polipropileno con una superficie basal de 1000 cm^2 (215x465x145 mm) sobre un suelo de virutas de madera de chopo *Populus spp.* (Salicaceae) de la marca Souralit 7/4 S. Los animales fueron alimentados con comida estándar, disponiendo de pellets comerciales de la marca SAFE (Scientific Animal Food Engineering; Augy, Francia), sin ningún tipo de restricción en el acceso a la comida y al agua, excepto durante la realización del experimento.

En la realización de los ensayos de biodisponibilidad, los animales se mantuvieron en ayunas durante las 12 h previas a la realización de la administración y toma de muestras. Durante todo el procedimiento tienen disponibilidad de agua *ad libitum*.

Previamente a la realización de los experimentos los animales se aclimataron, durante un mínimo de 72 horas, a las condiciones ambientales en una cámara silente, termostatzada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (08:00 – 20:00) y con control de la humedad ambiental (45 – 65%).

Los experimentos se realizaron siempre a las mismas horas del día con el fin de evitar posibles modificaciones debidas a los ciclos circadianos. Los animales de experimentación se utilizaron una sola vez para evitar alteraciones en la respuesta por fenómenos de tolerancia o aprendizaje.

La estabulación, manipulación y las distintas técnicas experimentales realizadas en este trabajo se realizaron de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, y el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia y la Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio elaborado por AAALAC International (*Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International*, Asociación internacional para la evaluación y acreditación de cuidado de animales de laboratorio).

4.12.2. Estudios de comportamiento

4.12.2.1. Fármacos, reactivos y otros compuestos químicos

Los fármacos y reactivos utilizados en los experimentos fueron reserpina, levodopa (LD), hidrocloreuro de R-(-)-deprenilo (selegilina), escopolamina, benserazida (B) y eserina, suministrados por Sigma-Aldrich S.A. La carboximetilcelulosa sódica (CMCNa), suministrada por Merck (Madrid, España) y la heparina sódica 5% (Rovi®). Las moléculas objeto de estudio fueron **CUM21**, **MC151**, **MJM272**, **MJM470**, **MJM511**, seleccionados a partir de los resultados obtenidos *in vitro* en relación con su actividad inhibitoria de MAO o colinesterasas.

4.12.2.2. Preparación de compuestos y fármacos

La carboximetilcelulosa sódica (CMCNa) se preparó en suspensión al 1% (peso/volumen) con agua Milli-Q® (Millipore Ibérica S.A., Madrid, España) en agitación constante durante un mínimo de 2 horas.

La reserpina se preparó disolviendo 1,25 mg en un volumen total de 10 mL de agua conteniendo un 1% de ácido acético glacial.

La escopolamina se preparó disolviendo 1 mg de producto sólido en 10 mL de agua Milli-Q®.

Tanto la LD (100 mg) como la B (25 mg) se suspendieron en 10 mL de CMCNa al 1%.

El R-(-)-deprenilo utilizado como fármaco de referencia en el modelo de EP se preparó disolviendo 10 mg del mismo en 10 mL de agua Milli-Q®, manteniéndolo en agitación durante 15 minutos.

La eserina utilizada como fármaco de referencia en el modelo de la EA se preparó disolviendo 0,25 mg en un volumen de 10 mL de agua Milli-Q®.

Las nuevas moléculas se suspendieron en CMCNa al 1% para preparar disoluciones de concentración 10 ó 1mg/mL, que se mantuvieron en agitación durante 24 horas.

4.12.2.3. Equipos y dispositivos de medida

La evaluación de la actividad locomotora en ratones modelo farmacológico de EP se realizó mediante el test de campo abierto (*Open Field Test, OFT*). La evaluación de la memoria en ratones modelo farmacológico de EA se realizó mediante el test de reconocimiento de objetos (*Object Recognition Test, ORT*).

En ambos casos, se dispuso a los animales de cada ensayo en una caja cuadrada negra de tamaño 1x1x0,30 metros que, a su vez, estaba subdividida en 4 arenas independientes de dimensiones 0,50x0,50x0,30 metros en las que se colocaron cada uno de los ratones de forma independiente (**Figura 65**).

La evaluación en el OFT y en el ORT se realizó desde una habitación adyacente a la de realización del experimento, utilizando para ello un sistema de videoregistro. El comportamiento de los animales se captó con una videocámara analógica (Sony DXC-107A, Sony Corporation) suspendida en el techo. La cámara está conectada a un adaptador (Sony CMA D2) que envía la señal a un monitor (Sony PVM-14M2E) y a dos tarjetas digitalizadoras:

4.12.2.4. *Test de campo abierto (OFT)*

Las nuevas moléculas **CUM21**, **MJM272**, **MJM470**, **MJM511**, **MC151** se evaluaron tanto en ratones sin tratamiento previo como en ratones reserpinizados modelo de la EP a la dosis de 100 mg/Kg en una suspensión de CMCNa al 1%. Las sustancias **MJM470** y **MC151**, que resultaron ser muy activas en ratones reserpinizados a dosis de 100 mg/Kg, también se evaluaron a la dosis de 10 mg/Kg tanto en animales sin tratamiento previo como en animales reserpinizados⁴¹⁰.

El R-(-)-deprenilo utilizado como fármaco de referencia y los derivados de cumarina arriba indicados se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) en una relación de volumen/peso del animal de 10 mL/Kg.

Los grupos de animales utilizados en el test de campo abierto fueron:

- Ratones sin tratamiento previo, a los que se le administró 22 horas antes del inicio del experimento CMCNa 1% vía i.p.
- Ratones reserpinizados utilizados como modelo farmacológico de la EP, a los que se les administró vía i.p. y 22 h antes del inicio del experimento una dosis de 1,25 mg/Kg de reserpina.

Se evaluó inicialmente el posible efecto de los compuestos objeto de estudio en ratones sin tratamiento previo. Para ello, se administró el vehículo (CMCNa al 1% i.p.), el fármaco de referencia (R-(-)-deprenilo, 10 mg/Kg, i.p.) o las nuevas moléculas objeto de estudio (100 ó 10 mg/Kg, i.p.) y 30 min después de ésta última administración se les inyectó LD:B (100:25 mg/Kg, i.p.) comenzando la evaluación de la actividad locomotora media hora después de la última administración y manteniéndola durante una hora. Una vez obtenidos los resultados, se llevó a cabo su análisis (**Figura 67**).

También se evaluó la posible potenciación por los nuevos derivados de cumarina o el R-(-)-deprenilo (utilizado como fármaco de referencia) del efecto de la LD:B en ratones previamente reserpinizados⁵²⁶.

Para ello, se administró reserpina (1,25 mg/Kg, i.p.) a los animales 22 horas antes de la realización de cada experimento. Transcurrido ese tiempo se les administró el

vehículo (CMCNa al 1% i.p.), el fármaco de referencia (R-(-)-deprenilo, 10 mg/Kg, i.p.) o las nuevas moléculas objeto de estudio (100 ó 10 mg/Kg, i.p.) y 30 min después de ésta última administración se les inyectó LD:B (100:25 mg/Kg, i.p.) comenzando media hora después de la última administración, la evaluación de la actividad locomotora durante una hora. Posteriormente, se llevó a cabo el análisis de los resultados obtenidos (Figura 67).

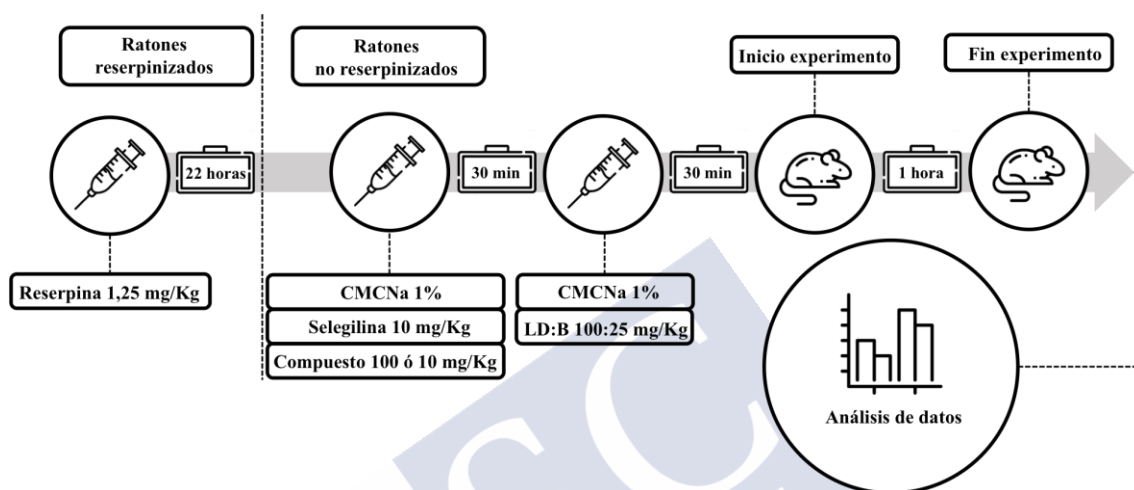


Figura 67. Esquema del proceso para evaluar los compuestos inhibidores de MAO-B en ratones sin tratamiento previo. Elaboración propia a partir de imágenes y gráficos creados por Freepik y disponibles a través de la web: www.flaticon.com

La grabación del vídeo en directo del experimento *in vivo*, permitió el análisis de comportamientos no susceptibles de automatización.

En cada ensayo se evaluaron los parámetros:

- Distancia recorrida (cm)
- Velocidad media (cm/s)
- Porcentaje de tiempo en movimiento (%)

4.12.2.5. Test de reconocimiento de objeto (ORT)

Para evaluar la posible actividad inhibidora de ChE *in vivo*, se estudió el efecto del nuevo derivado de cumarina **MJM255** a la dosis de 25 mg/Kg, preparado en una suspensión de CMCNa al 1%, tanto en ratones sin tratamiento previo, como en ratones tratados previamente con escopolamina, utilizados como modelo farmacológico de la EA⁴¹¹.

Como fármaco de referencia se utilizó eserina, a una dosis de 0,25 mg/Kg.

El compuesto **MJM255** y la eserina se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) en una relación de volumen/peso del animal de 10 mL/Kg.

Los grupos de animales utilizados en el test de reconocimiento de objeto nuevo fueron:

- Ratones sin tratamiento previo, a los que se le administró 30 minutos antes del inicio del experimento SSF 0,9 % vía i.p.
- Ratones tratados 30 minutos antes del inicio del experimento con una dosis de 1 mg/Kg de escopolamina utilizados como modelo farmacológico de la EA.

Independientemente del grupo de tratamiento, 15 minutos antes de iniciar el experimento, a los animales se les administró el vehículo (CMCNa al 1% i.p.), el fármaco de referencia (eserina 0,25 mg/Kg) o la nueva molécula objeto de estudio (25 mg/Kg i.p.).

Los objetos elegidos para el test *ORT* fueron prismas rojos (OBJ 1 y OBJ2) y pirámides violetas (OBJ 3). Los objetos se situaron a 10 cm de los bordes más próximos a la pared de las subdivisiones y a 30 cm de distancia entre ellos en dos lugares diferentes denominados Zona A y Zona B. Se definió una distancia alrededor de cada zona de 4 cm.

Los experimentos se llevaron a cabo en dos fases diferentes (Fase 1 y Fase 2) ambas de 10 minutos de duración y separadas entre ellas 10 minutos. Durante la Fase 1, tanto en la Zona A como en la Zona B se colocó un prisma rojo (OBJ 1 en la Zona A y OBJ 2 en la Zona B). Durante la Fase 2 se mantuvo el OBJ 1 en la Zona A y se sustituyó el OBJ 2 en la Zona B por el OBJ 3 (pirámide violeta).

Durante los 10 primeros minutos del ensayo (Fase 1), los animales se colocaron en las correspondientes arenas. Transcurrido ese tiempo, se retiró a los animales de las arenas y se estabularon nuevamente en la jaula correspondiente. Durante el periodo de 10 minutos de descanso entre la Fase 1 y la Fase 2, tanto las arenas como los objetos (repetidos y nuevos) se limpiaron con agua con un 15% de etanol para evitar

interferencias debidas al olor. A continuación, los animales se colocaron nuevamente en la caja (Fase 2) (**Figura 68**).

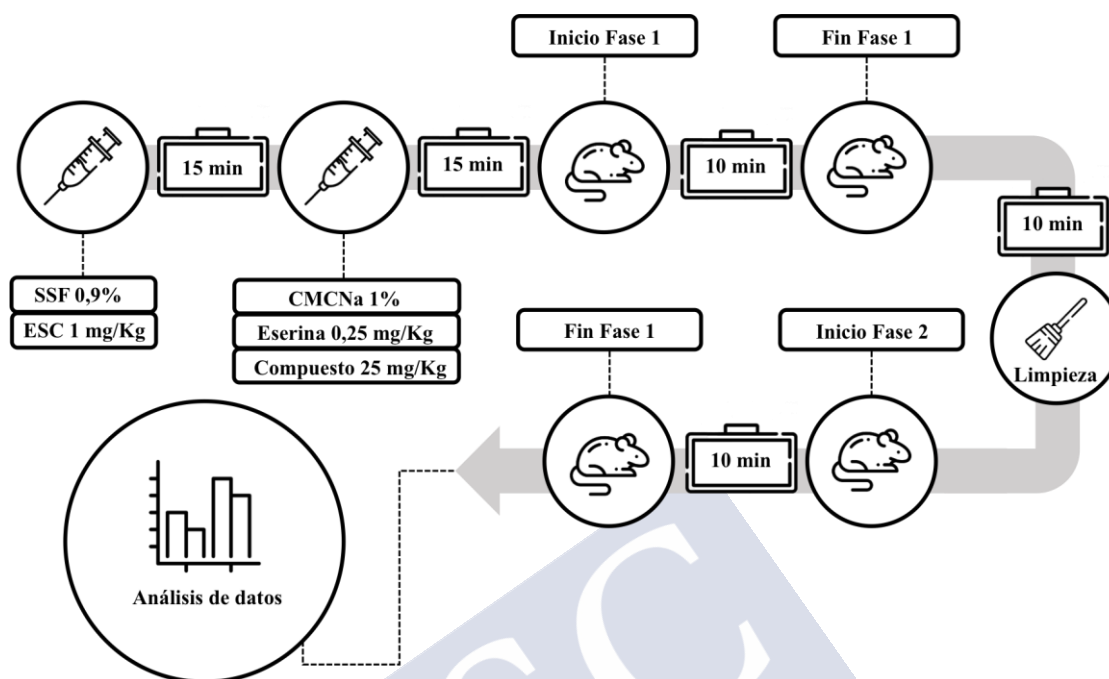


Figura 68. Esquema del proceso para evaluar el MJM255 como posible inhibidor de AChE in vivo. Elaboración propia a partir de imágenes y gráficos creados por Freepik y disponibles a través de la web: www.flaticon.com

En cada ensayo se evaluó:

- Latencia primera aproximación (s)
- Frecuencia de aproximaciones (nº)
- Tiempo en zona (s)

4.12.2.6. Expresión de los resultados, análisis estadístico y representación gráfica

Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de la media (e.e.m.) de, al menos, 8 animales ($n=8$). El análisis estadístico y la representación gráfica se realizaron con el programa Graphpad Prism® (v 6.0) (San Diego, USA). Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante el test ANOVA de una vía (tratamiento) seguido del test de Dunnet o por el test ANOVA de dos vías (tratamiento-tiempo) seguido del test de Bonferroni.

4.12.3. Estudio de biodisponibilidad

4.12.3.1. Preparación de las diluciones de compuestos y fármacos

Las moléculas objeto de estudio son los derivados cumarínicos **CUM21**, **MJM255**, **MJM272**, **MJM470** y **MC151**. Fueron seleccionados, como se describió previamente en la sección **4.12.**, a partir de los resultados obtenidos *in vitro* en el estudio de su actividad inhibitoria sobre MAO-B y AChE.

Los compuestos se prepararon a una concentración de 3 mg/mL en una suspensión de CMCNa 1% y se mantuvieron en agitación durante 24 h. La CMCNa se preparó al 1% (peso/volumen) con agua Milli-Q® (Millipore Ibérica S.A., Madrid, España) en agitación constante durante un mínimo de 2 horas. El número de animales utilizados en cada experimento fue de, al menos, 5 (n=5).

4.12.3.2. Administración, tratamiento y toma de muestras

Los compuestos y reactivos utilizados en los estudios de biodisponibilidad, se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) o por vía oral (p.o.) en una relación de volumen/peso del animal de 10 mL/Kg. En ambas vías se administraron dosis de 30 mg/Kg de los compuestos indicados.

Las muestras de sangre venosa de los animales se recogieron a tiempos t_0 , $t_{1/2}$, t_1 , t_3 , t_6 y t_{24} horas posteriores a la administración (ya sea vía oral o vía intraperitoneal) de los compuestos, mediante extracción de una de las venas caudales.

Los ratones fueron introducidos en una estufa a 35 °C durante los 15 minutos previos a la toma de muestra para conseguir una vasodilatación adecuada. La toma de muestra se lleva a cabo con los animales inmovilizados en cepos y se realizó en la vena caudal, situada en la zona lateral de la cola de los ratones. Para ello se utilizaron jeringas de insulina de un cuerpo precargadas con suero fisiológico isotónico (NaCl 0,9% pH 7,4, 300 mOsm/kg) heparinizado (300 UI).

Las muestras de sangre obtenidas se introdujeron en capilares heparinizados (heparina:sangre, 1:10) para su centrifugación a 1500 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga Selecta con rotor de tubos de hematocrito. Las

muestras de plasma recuperadas, de entre 20-40 μL de volumen, se almacenaron congeladas a -20°C hasta su posterior utilización (**Figura 69**).

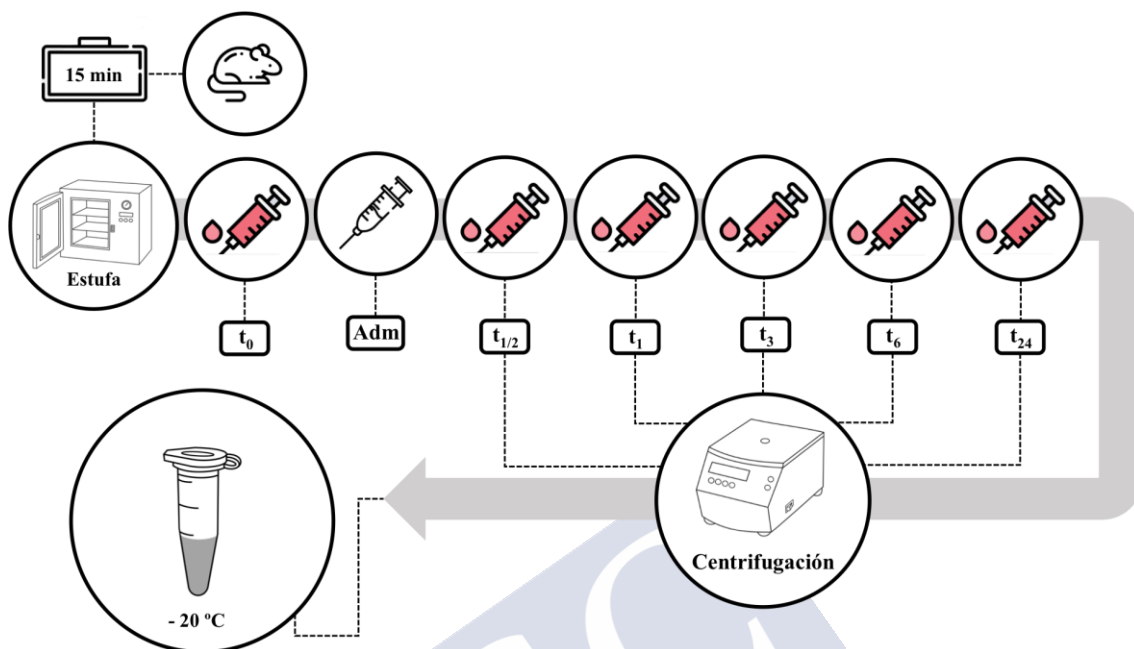


Figura 69. Esquema del proceso de administración y toma de muestras. Elaboración propia a partir de imágenes y gráficos creados por Freepik y disponibles a través de la web: www.flaticon.com

4.12.3.3. Preparación de las muestras de plasma

Para la determinación de la cantidad del derivado de cumarina presente en el plasma de los animales, se tomaron 20 μL de las muestras obtenidas previamente descongeladas y se añadieron sobre 300 μL de acetonitrilo, con el fin de precipitar las posibles proteínas que hubieran quedado en el plasma.

Los viales se centrifugaron a 15.700 $\times g$ durante 30 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga Eppendorf 5415 R. El sobrenadante obtenido se conservó a -20°C hasta su posterior análisis.

4.12.3.4. Identificación de los patrones

Inicialmente, y con el fin de tener perfectamente identificados los compuestos objeto de estudio, se elaboraron los patrones de referencia. Para ello se prepararon disoluciones de cada uno de los compuestos a una concentración 10 mg/L (10 ppm)⁴¹².

Debido a los problemas de solubilidad en agua de los compuestos, estos se disolvieron en una mezcla de metanol y agua (80:20). Una vez disueltos, las disoluciones se filtraron utilizando filtros de polifluoruro de vinilideno (PVDF) de 25 mm de diámetro y con un tamaño de poro 0,20 μm (Fisher Scientific).

Con el propósito de ajustar de forma eficaz el HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) para nuestras muestras, se realizó un barrido de longitudes de onda utilizando el espectrofotómetro (Evolution 220 UV-Visible Spectrophotometer, ThermoScientific), determinando posteriormente el punto máximo de absorbancia de cada compuesto que se utilizó como longitud de onda analítica (**Tabla 16**).

Tabla 16. Longitud de onda de máxima absorbancia de cada uno de los derivados de cumarina seleccionados para el estudio de biodisponibilidad.

COMPUESTO	λ (nm)
CUM21	340
MC151	205
MJM255	280
MJM272	340
MJM470	380

Para la identificación y cuantificación de los patrones se usó la cromatografía líquida de alta eficacia HPLC, utilizando un equipo Agilent Technologies 1200 Series Quaternary y una Columna C18 Phenosphere 3 μm 80A (150x3,20 mm) y flujo de 0,7 mL/min. Como fase móvil para la resolución de los diferentes compuestos se empleó un gradiente lineal de agua:acetonitrilo que partía inicialmente de una proporción (4:1) y finalizaba en 10 min solo con acetonitrilo. Los tiempos de retención de los derivados de cumarina seleccionados, expresados en minutos, se muestran en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Tiempo de retención para cada uno de los derivados de cumarina seleccionados para el estudio de biodisponibilidad.

COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)
CUM21	14,60
MC151	18,00
MJM255	17,07
MJM272	13,85
MJM470	17,40

4.12.3.5. Identificación y cuantificación de las muestras biológicas

Una vez identificados los compuestos y elaboradas las correspondientes rectas de calibrado de los patrones previamente preparados, se procedió al análisis de las muestras. Para ello, se depositaron 100 μL de cada una de las muestras, previamente filtradas, usando filtros de 0,22 μM de poro, en viales *Insert* (Thermo Fisher) que se introdujeron en frascos de vidrio de 2 mL para su análisis en HPLC.

4.12.3.6. Presentación de los datos

Los datos se muestran mediante cromatogramas obtenidos a partir del programa ChemStation for LC 3D system, seleccionando la λ a la que se realizó el barrido, representando la absorbancia y el tiempo de retención.







RESULTADOS



5. RESULTADOS

5.1. ACTIVIDAD INHIBIDORA SOBRE LAS ISOFORMAS DE LA ENZIMA MAO (IMAO) DE LOS DERIVADOS DE CUMARINA

En nuestros experimentos y bajo nuestras condiciones experimentales, descritas en el apartado de material y métodos, la MAO-A humana presentó una constante de Michaelis (K_m) de $457,17 \pm 38,62 \mu\text{M}$ y una velocidad de reacción máxima ($V_{\text{máx}}$) de $185,67 \pm 12,06$ nmoles/min/mg de proteína; por su parte, la MAO-B humana mostró unos valores de K_m de $220,33 \pm 32,80 \mu\text{M}$ y $V_{\text{máx}}$ de $24,32 \pm 1,97$ nmoles/min/mg de proteína.

En general, los compuestos evaluados (derivados de cumarina e inhibidores de referencia) no reaccionaron directamente con el reactivo Amplex[®] Red, lo cual indica que no modificaron la fluorescencia generada en la mezcla de reacción por inhibición enzimática. Para los compuestos **CUM61**, **SMA1**, **SMB1**, **H1i2**, **H1i3**, **H1J2**, **H1K3**, **H1L2**, sí se apreció un incremento de fluorescencia debido a la reacción con el reactivo Amplex[®] Red.

Por otro lado, los compuestos **CUM11**, **CUM71**, **A1J**, **B1B**, **B1K**, **J1J**, **K1K** y **L1L** emitieron fluorescencia al ser estimulados a λ 545 nm, utilizada en los experimentos, por lo que su actividad inhibidora de MAO no pudo ser determinada utilizando el método anteriormente descrito.

Tanto los inhibidores de referencia como los nuevos compuestos con actividad IMAO, inhibieron la actividad enzimática de forma dependiente de la concentración.

El agua Milli-Q[®] y el DMSO utilizados como vehículo no tuvieron efecto farmacológico significativo en los ensayos.

5.1.1. Actividad inhibidora sobre las isoformas de la enzima MAO de los derivados de 3-fenilcumarina

Los derivados de 3-fenilcumarina estudiados incluyen un fragmento de *trans*-estilbeno en su estructura por lo que pueden ser considerados análogos híbridos resveratrol-cumarina. Presentan uno o varios sustituyentes hidroxilos en las posiciones 6, 7 u 8 de la cumarina, excepto los compuestos **CUM9** y **CUM10**, en los que el sustituyente en posición 7 de la cumarina es un grupo metoxilo. Así mismo, se estudió como afecta a la actividad IMAO de estos derivados la sustitución con grupos hidroxilo o metoxilo en las posiciones *meta* y/o *para* del fenilo en posición 3.

Tabla 18. Valores de CI_{50} o % de inhibición a concentración 100 μ M (valor recogido entre paréntesis) de los compuestos estudiados e inhibidores de referencia sobre la actividad enzimática de las isoformas de la MAO, presentes en la fracción microsomal preparada a partir de células de insectos (BTI-TN-5B1-4) infectadas con baculovirus que contienen insertos de ADN responsables de la biosíntesis de la MAO-A o MAO-B humanas.

COMPUESTO	CI_{50} hMAO-A (μ M) (% inhibición a 100 μ M)	CI_{50} hMAO-B (μ M) (% inhibición a 100 μ M)	Índice de Selectividad ^a (IS)
CUMa	(26,15% \pm 1,75%)	2,58 \pm 0,17	> 38,73 ^b
CUM1a	26,53 \pm 1,78	12,85 \pm 0,86	2,06
CUM9	**	0,49 \pm 0,03	>204 ^b
CUM10	38,33 \pm 2,49	0,18 \pm 0,02	212,94
CUM12	16,62 \pm 4,18	0,92 \pm 0,01	18,07
CUM21	(20,14% \pm 1,35%)	1,05 \pm 0,07	> 95,24 ^b
CUM21C	15,54 \pm 1,05	(29,60% \pm 1,99%)	< 0,16 ^b
CUM32	14,49 \pm 0,97	19,74 \pm 1,32	0,73
CUM41	13,61 \pm 0,92	14,83 \pm 0,66	0,92
CUM51	9,03 \pm 0,61	(49,92% \pm 3,35%)	< 0,09 ^b
CUM81	(48,29% \pm 3,24%)	8,88 \pm 0,60	>11,26 ^b
CUM91	19,83 \pm 1,34	(47,89% \pm 3,21%)	<0,20 ^b
JLG5b	1,95 \pm 0,13	5,47 \pm 0,37	0,36
JLG9b	26,03 \pm 1,75	(52,08% \pm 3,49%)	>0,26 ^b
JLG12b	4,16 \pm 0,28	(50,03% \pm 3,36%)	>0,04 ^b
MJM43b	3,14 \pm 0,21	10,07 \pm 0,68	<0,31 ^b
<i>t</i> -RESV	17,36 \pm 0,65	30,77 \pm 0,99	0,56
Clorgilina	0,005 \pm 0,0009	63,41 \pm 1,20	0,000082
R-(-)-deprenilo	68,73 \pm 4,21	0,017 \pm 0,002	4043
lproniazida	6,56 \pm 0,76	7,54 \pm 0,36	0,87

Cada valor de CI_{50} es la media \pm e.e.m. de 5 experimentos (n=5). **Inactivo a 100 μ M (mayor concentración estudiada, inhibición menor al 20%). A concentraciones superiores, el compuesto precipita. ^aÍndice de selectividad MAO-B = [CI_{50} (MAO-A) / CI_{50} (MAO-B)]. ^bValor calculado considerando como CI_{50} frente a la MAO-B la mayor concentración estudiada (100 μ M).

Como se observa en la **Tabla 18**, la mayoría de los compuestos estudiados mostraron actividad inhibidora de una o ambas isoformas de la MAO en el rango de concentración μM .

La sustitución con un grupo hidroxilo en posición *para* del fenilo en posición 3 de la cumarina (**CUMa**) condujo a un derivado IMAO-B selectivo, mientras que cuando el grupo hidroxilo se situó en la posición 7 de la 3-fenilcumarina (**CUMIa**), se obtuvo un derivado menos potente y menos selectivo sobre la isoforma B. La sustitución en ambas posiciones con grupos hidroxilo (**CUM41**) condujo igualmente a una disminución de la actividad inhibidora y de la selectividad sobre la MAO-B. El reemplazo de uno o ambos grupos hidroxilo de **CUM41** por grupos metoxilo (**CUM9**, **CUM10** y **CUM12**) condujo a los inhibidores más potentes de esta serie. Aunque los tres derivados mostraron actividad sobre la isoforma B en el rango nanomolar alto y una importante selectividad por esta isoforma, la presencia del grupo metoxilo en posición 7 de la 3-fenilcumarina condujo a los derivados más potentes (**CUM 9** y **CUM10**).

La sustitución con un grupo hidroxilo en posición 6 de la 3-fenilcumarina resultó más interesante para la actividad inhibidora de MAO-B que su presencia en posición 7; **CUM 81** es casi 2 veces más potente y mucho más selectivo sobre la MAO-B que **CUM 41**. Sin embargo, la introducción de un sustituyente hidroxilo adicional en posición 8 de la cumarina (**CUM 32**) condujo a una pérdida de actividad y selectividad sobre la isoforma B de la MAO.

En relación al incremento de sustituyentes hidroxilo sobre el fenilo de la posición 3 de la cumarina, los derivados **CUM21C**, **CUM91** y **CUM51**, los tres con dos grupos hidroxilo en posiciones *meta*, presentaron una mayor actividad frente a la isoforma A. Sin embargo, **CUM21**, con dos grupos metoxilo en posiciones *meta* del fenilo de la posición 3 de la cumarina, resultó ser un inhibidor potente y selectivo de la isoforma MAO-B.

También mostraron mayor actividad sobre la isoforma A de la MAO el compuesto **JLG9b** (sin sustituyentes en el fenilo pero con grupos hidroxilo en posiciones 5 y 7 de la cumarina) y el compuesto **JLG12b**, que en relación al anterior presenta dos sustituyentes hidroxilo adicionales en las posiciones *meta* y *para* del fenilo. Esta

sustitución aumentó la actividad sobre la isoforma A (**JLG12b** es aproximadamente 6 veces más potente como IMAO-A que **JLG9b**). Sin embargo, esta modificación parece no afectar a la actividad sobre la isoforma B, pues en ambos casos fue muy similar. El cambio de posición de los sustituyentes hidroxilo sobre el anillo de cumarina a las posiciones 7 y 8 (**JLG5b**) condujo a un incremento de la actividad sobre ambas isoformas, pero contrariamente a lo esperado, la sustitución de los hidroxilos de las posiciones 4' y 5' del fenilo de la posición 3 por grupos metoxilo (**MJM43b**) condujo a un descenso de las mismas.

5.1.2. Actividad inhibidora sobre las isoformas de la enzima MAO de los derivados de 3-(tiofen-2-il)cumarina

Se estudió el efecto sobre la actividad IMAO de la sustitución con grupos hidroxilo en posiciones 7 y/o 8 de los derivados de 3-(tiofen-2-il)cumarina, así como de la presencia de un halógeno (Br) en la posición 4 del anillo de tiofeno.

En la **Tabla 19** se observa que la sustitución con un grupo hidroxilo en posición 8 de la cumarina dio lugar a compuestos inhibidores de MAO-A (**MJM450** y **MJM465**), mientras que la sustitución en 7 (**MJM451** y **MJM470**) o en 7 y 8 (**MJM452** y **MJM471**), originó derivados con actividad sobre ambas isoformas de la enzima.

Tabla 19. Valores de CI_{50} o % de inhibición a concentración 100 μM (valor recogido entre paréntesis) de los compuestos estudiados e inhibidores de referencia sobre la actividad enzimática de las isoformas de la MAO, presentes en la fracción microsomal preparada a partir de células de insectos (BTI-TN-5B1-4) infectadas con baculovirus que contienen insertos de ADN responsables de la biosíntesis de la MAO-A o MAO-B humanas.

COMPUESTO	CI_{50} hMAO-A (μM) (% inhibición a 100 μM)	CI_{50} hMAO-B (μM) (% inhibición a 100 μM)	Índice de Selectividad ^a (IS)
MJM450	17,64 \pm 1,18	(44,12% \pm 2,96%)	<0,18 ^b
MJM451	7,62 \pm 0,51	8,50 \pm 0,57	0,90
MJM452	1,32 \pm 0,09	4,75 \pm 0,32	0,28
MJM465	6,21 \pm 0,42	(54,68% \pm 3,67%)	<0,06 ^b
MJM470	9,16 \pm 0,61	0,14 \pm 0,01	65,43
MJM471	6,08 \pm 0,41	21,75 \pm 1,46	0,28
t-RESV	17,36 \pm 0,65	30,77 \pm 0,99	0,56
Clorgilina	0,005 \pm 0,0009	63,41 \pm 1,20	0,000082
R-(-)-deprenilo	68,73 \pm 4,21	0,017 \pm 0,002	4043
lproniazida	6,56 \pm 0,76	7,54 \pm 0,36	0,87

Cada valor de CI_{50} es la media \pm e.e.m. de 5 experimentos (n=5). ^aÍndice de selectividad MAO-B = [CI_{50} (MAO-A) / CI_{50} (MAO-B)]. ^bValor calculado considerando como CI_{50} frente a la MAO-B la mayor concentración estudiada (100 μM).

Para los derivados de 3-(tiofen-2-il)cumarina con un único grupo hidroxilo en posición 7 u 8, la presencia de un átomo de bromo en posición 4 del anillo de tiofeno conduce a un incremento de la actividad inhibidora de MAO-B. El derivado 3-(4-bromotiofen-2-il)-7-hidroxycumarina (**MJM470**) resultó ser el inhibidor más potente de la serie sobre la isoforma B con un IS = 65,43.

5.1.3. Actividad inhibidora sobre las isoformas de la enzima MAO de los derivados de 3-(6-oxo-1,6-dihidropiridazin-3-il)cumarina

Se estudiaron una serie de derivados 3-(6-oxo-1,6-dihidropiridazin-3-il)cumarina, algunos de los cuales presentan un sustituyente bencilo o metilo sobre uno de los nitrógenos (N1) del anillo de piridazina y adicionalmente incorporan sobre el esqueleto de cumarina sustituyentes metilo o metoxilo en posiciones 6, 7 u 8.

La sustitución con un grupo metilo en posición N1 del anillo de piridazina resultó esencial para la actividad ya que, como se observa en la **Tabla 20**, ninguno de los derivados de 3-(6-oxo-1,6-dihidropiridazin-3-il)cumarina y 3-(N1-bencil-6-oxo-1,6-dihidropiridazin-3-il)cumarina presentó una actividad destacable frente a ninguna de las isoformas de la MAO.

Tabla 20. Valores de CI_{50} o % de inhibición a concentración 100 μM (valor recogido entre paréntesis) de los compuestos estudiados e inhibidores de referencia sobre la actividad enzimática de las isoformas de la MAO, presentes en la fracción microsomal preparada a partir de células de insectos (BTI-TN-5B1-4) infectadas con baculovirus que contienen insertos de ADN responsables de la biosíntesis de la MAO-A o MAO-B humanas.

COMPUESTO	CI_{50} hMAO-A (μM) (% inhibición a 100 μM)	CI_{50} hMAO-B (μM) (% inhibición a 100 μM)	Índice de Selectividad ^a (IS)
MC74	**	**	-----
MC76	**	(41,83% \pm 2,81%)	-----
MC77	**	**	-----
MC78	**	(21,62% \pm 1,45%)	-----
MC79	**	**	-----
MC80	(32,59% \pm 2,19%)	(20,32% \pm 1,36%)	-----
MC81	**	(22,18% \pm 1,49%)	-----
MC84	**	45,36 \pm 3,04	>2,20 ^b
MC85	**	(53,22% \pm 3,57%)	-----
MC86	**	(57,02% \pm 3,82%)	-----
MC87	**	50,41 \pm 3,38	>1,98 ^b
MC88	**	38,21 \pm 2,56	>2,62 ^b

COMPUESTO	CI_{50} hMAO-A (μM) (% inhibición a 100 μM)	CI_{50} hMAO-B (μM) (% inhibición a 100 μM)	Índice de Selectividad ^a (IS)
MC89	**	18,64 \pm 1,25	>5,36 ^b
MC91	**	(36,78% \pm 2,47%)	-----
MC95	**	**	-----
MC96	**	**	-----
MC97	**	(44,35% \pm 2,98%)	-----
MC98	**	(23,81% \pm 1,60%)	-----
<i>t</i> -RESV	17,36 \pm 0,65	30,77 \pm 0,99	0,56
Clorgilina	0,005 \pm 0,0009	63,41 \pm 1,20	0,000082
R-(-)-deprenilo	68,73 \pm 4,21	0,017 \pm 0,002	4043
Iproniazida	6,56 \pm 0,76	7,54 \pm 0,36	0,87

Cada valor de CI_{50} es la media \pm e.e.m. de 5 experimentos (n=5). ** Inactivo a 100 μM (mayor concentración estudiada, inhibición menor al 20%). A concentraciones superiores, los compuestos precipitan. ^aÍndice de selectividad MAO-B = [CI_{50} (MAO-A) / CI_{50} (MAO-B)]. ^bValor calculado considerando como CI_{50} frente a la MAO-B la mayor concentración estudiada (100 μM).

En relación con la sustitución sobre el fenilo de la cumarina con grupos metilo o metoxilo, la posición 7 parece la más adecuada para la sustitución. **MC88** con un sustituyente metoxilo y **MC89** con un sustituyente metilo en esa posición resultaron ser los inhibidores más potentes de la MAO-B en esta serie. Además, se pudo observar que el sustituyente metilo en posiciones 6, 7 u 8 de la cumarina conduce a derivados más potentes como inhibidores de MAO-B que un sustituyente metoxilo en las mismas posiciones.

5.1.4. Actividad inhibidora sobre las isoformas de la enzima MAO de los derivados de 3-(piridazin-3-il)cumarina

Se estudiaron una serie de derivados 3-(piridazin-3-il)cumarina, los cuales presentan un halógeno (Cl o Br) o un grupo metoxilo sobre la posición 6 del anillo de piridazina y adicionalmente, en algunos casos, incorporan sobre el esqueleto de cumarina sustituyentes halógeno, metilo o metoxilo en posiciones 6, 7 u 8.

Analizando los resultados presentados en la **Tabla 21**, la presencia de un halógeno (Cl o Br) en posición 6 del anillo de piridazina parece ser mejor para la actividad inhibidora de la MAO-B que un grupo metoxilo cuando se combina con un sustituyente metilo o metoxilo en posiciones 6 ó 7 del esqueleto de cumarina. Así, **MC82**, **MC99**,

MC103, MC104, MC144, MC145, MC146 y MC147 resultaron más potentes IMAO-B que **MC93, MC100, MC107 y MC108**. Además, parece que un grupo metilo en posición 8 permite mantener la actividad IMAO-B de estos derivados (**MC102, MC106 y MC148**). Sin embargo, un grupo metoxilo en esta posición (**MC101, MC105 y MC149**) disminuye la actividad y la selectividad.

Tabla 21. Valores de CI_{50} o % de inhibición a concentración 100 μ M (valor recogido entre paréntesis) de los compuestos estudiados e inhibidores de referencia sobre la actividad enzimática de las isoformas de la MAO, presentes en la fracción microsomal preparada a partir de células de insectos (BTI-TN-5B1-4) infectadas con baculovirus que contienen insertos de ADN responsables de la biosíntesis de la MAO-A o MAO-B humanas.

COMPUESTO	CI_{50} hMAO-A (μ M) (% inhibición a 100 μ M)	CI_{50} hMAO-B (μ M) (% inhibición a 100 μ M)	Índice de Selectividad ^a (IS)
MC82	(34,43% \pm 2,31%)	13,54 \pm 0,91	>7,39 ^b
MC93	**	17,62 \pm 1,18	>5,68 ^b
MC99	**	8,80 \pm 0,59	>11,36 ^b
MC100	(21,24% \pm 1,42%)	11,10 \pm 0,74	>9,01 ^b
MC101	**	30,11 \pm 2,02	>3,32 ^b
MC102	(21,28% \pm 1,43%)	22,70 \pm 1,52	>4,41 ^b
MC103	**	19,17 \pm 1,29	>5,22 ^b
MC104	**	2,51 \pm 0,17	>39,92 ^b
MC105	**	(33,56% \pm 2,25%)	>2,98 ^b
MC106	**	5,35 \pm 0,36	>18,71 ^b
MC107	**	(53,21% \pm 3,57%)	>1,88 ^b
MC108	**	13,50 \pm 0,91	>7,41 ^b
MC124	**	42,31 \pm 2,84	>2,36 ^b
MC143	**	0,99 \pm 0,07	>101,01 ^b
MC144	(24,42% \pm 1,58%)	2,16 \pm 0,15	>46,36 ^b
MC145	(35,63% \pm 2,39%)	0,56 \pm 0,04	>177,94 ^b
MC146	**	0,75 \pm 0,05	>134,23 ^b
MC147	(25,66% \pm 1,72%)	3,05 \pm 0,20	>32,82 ^b
MC148	(34,13% \pm 2,29%)	2,64 \pm 0,18	>37,88 ^b
MC149	**	12,85 \pm 0,86	>7,78 ^b
MC150	**	0,36 \pm 0,02	>277,78 ^b
MC151	(35,02% \pm 2,35%)	0,060 \pm 0,004	>1666,67 ^b
MC152	(30,42% \pm 2,04%)	1,52 \pm 0,10	>65,79 ^b
MC153	(26,28% \pm 1,76%)	10,22 \pm 0,69	>9,78 ^b
MC154	(24,48% \pm 1,64%)	1,43 \pm 0,10	>69,93 ^b
MC155	(35,65% \pm 2,39%)	18,64 \pm 1,25	>5,36 ^b
MC156	(40,03% \pm 2,69%)	0,17 \pm 0,01	>588,24 ^b
MC157	(41,74% \pm 2,80%)	0,97 \pm 0,07	>103,09 ^b

COMPUESTO	CI_{50} hMAO-A (μ M) (% inhibición a 100 μ M)	CI_{50} hMAO-B (μ M) (% inhibición a 100 μ M)	Índice de Selectividad ^a (IS)
MC158	(36,65% \pm 2,46%)	17,13 \pm 1,15	>5,84 ^b
MC159	(34,65% \pm 2,32%)	6,79 \pm 0,46	>14,73 ^b
<i>t</i> -RESV	17,36 \pm 0,65	30,77 \pm 0,99	0,56
Clorgilina	0,005 \pm 0,0009	63,41 \pm 1,20	0,000082
R-(-)-deprenilo	68,73 \pm 4,21	0,017 \pm 0,002	4043
Iproniazida	6,56 \pm 0,76	7,54 \pm 0,36	0,87

Cada valor de CI_{50} es la media \pm e.e.m. de 5 experimentos (n=5). ** Inactivo a 100 μ M (mayor concentración estudiada, inhibición menor al 20%). A concentraciones superiores, los compuestos precipitan. ^aÍndice de selectividad MAO-B = [CI_{50} (MAO-A) / CI_{50} (MAO-B)]. ^bValor calculado considerando como CI_{50} frente a la MAO-B la mayor concentración estudiada (100 μ M).

En términos generales, con la excepción del compuesto **MC157**, se pudo observar que un átomo de bromo en posición 6 del anillo de piridazina conduce a inhibidores más potentes y selectivos que un átomo de cloro localizado en la misma posición. 3-(6-bromopiridazin-3-il)cumarina (**MC143**), sin ningún sustituyente adicional en el esqueleto de cumarina presentó una actividad inhibidora de MAO-B casi comparable a los 6-metoxi y 7-metil análogos **MC145** y **MC146**, respectivamente. La sustitución con un átomo de bromo en esas mismas posiciones incrementó significativamente la actividad inhibidora de la MAO-B en relación con la presencia de grupos metilo o metoxilo; **MC150** es más potente que **MC144** y **MC145**, mientras **MC151** es más potente que **MC146** y **MC147**.

Sin embargo es necesario matizar que la presencia de un átomo de halógeno (Cl o Br) en posiciones 6, 7 ó 8 del esqueleto de cumarina de **MC143** tuvo resultados diferentes sobre la actividad. Mientras la presencia de un átomo de cloro en posición 6 ó 8 de la cumarina o un átomo de bromo en posición 8, disminuyó la actividad; un átomo de bromo en posición 6 incrementó ligeramente la potencia y la selectividad y ese incremento fue mucho más significativo cuando el átomo de bromo se localizó en posición 7, originando el derivado **MC151**, que resultó el inhibidor MAO-B con mayor actividad de esta serie. **MC151** presenta actividad inhibidora de la MAO-B en el mismo rango de concentración que el R-(-)-deprenilo, fármaco de referencia, y es casi 513 veces más potente que el *trans*-RESV como IMAO-B.

La introducción de un átomo de halógeno (Cl o Br) en el núcleo de cumarina de 3-(6-cloropiridazin-3-il)cumarina (**MC124**) incrementó su actividad inhibidora de MAO-B entre 23 y 249 veces dependiendo del tipo de halógeno y su posición sobre la cumarina (derivados **MC155**, **MC156**, **MC157**, **MC158** y **MC159**). Los mejores resultados de potencia y selectividad se obtuvieron para los isómeros **MC156** y **MC157** con un átomo de bromo en posiciones 7 y 8 respectivamente.

5.1.5. Actividad inhibidora sobre las isoformas de la enzima MAO de los derivados de 3-benzamidocumarina

Se ha estudiado una serie de derivados de cumarina en los que se introdujo un grupo amido entre el sustituyente fenilo en posición 3 y la cumarina. Se analizó el interés de la sustitución del grupo benzamido resultante con uno o varios grupos electrodonadores o electroattractores y la presencia de un sustituyente hidroxilo en posición 4 de la cumarina.

La mayoría de los derivados estudiados resultaron ser inhibidores selectivos de la MAO-B. En la **Tabla 22** se observa que la introducción de sustituyentes sobre el grupo benzamido en posición 3 de la cumarina condujo a una disminución de la actividad de estos derivados sobre la MAO-B. La sustitución con un átomo de cloro en posición *para*, conduce a un derivado más potente (**MJM253**) que la sustitución con un grupo metilo (**MJM249**), a su vez este es más favorable para la actividad que un grupo metoxilo (**MJM247**), mientras que la presencia de un grupo nitro en esa posición conduce a un derivado inactivo (**MJM255**). Uno o dos sustituyentes adicionales en posición *meta* del grupo benzamido, independientemente de su naturaleza, conducen a una pérdida de actividad; así **MJM253** resultó ser más potente como IMAO-B que 3-(3',4'-diclorobenzamido)cumarina (**MJM254**) y **MJM247** que 3-(3',4'-dimetoxibenzamido)cumarina (**MJM252**) y 3-(3',4',5'-trimetoxibenzamido)cumarina (**MJM223**).

Tabla 22. Valores de CI_{50} o % de inhibición a concentración 100 μM (valor recogido entre paréntesis) de los compuestos estudiados e inhibidores de referencia sobre la actividad enzimática de las isoformas de la MAO, presentes en la fracción microsomal preparada a partir de células de insectos (BTI-TN-5B1-4) infectadas con baculovirus que contienen insertos de ADN responsables de la biosíntesis de la MAO-A o MAO-B humanas.

COMPUESTO	CI_{50} hMAO-A (μM) (% inhibición a 100 μM)	CI_{50} hMAO-B (μM) (% inhibición a 100 μM)	Índice de Selectividad ^a (IS)
MJM223	**	72,58 \pm 4,87	> 1,38 ^b
MJM229	(21,17% \pm 1,42%)	36,91 \pm 2,48	> 2,71 ^b
MJM246	**	0,76 \pm 0,05	> 131,58 ^b
MJM247	(21,40% \pm 1,37%)	30,50 \pm 2,05	> 3,27 ^b
MJM249	**	7,96 \pm 0,53	> 12,56 ^b
MJM252	(35,67% \pm 2,39%)	58,38 \pm 3,92	> 1,71 ^b
MJM253	**	1,95 \pm 0,13	> 51,28 ^b
MJM254	**	5,95 \pm 0,40	> 16,81 ^b
MJM255	**	(23,00% \pm 1,54%)	-----
MJM256	**	(28,60% \pm 1,92%)	-----
MJM257	**	**	-----
MJM258	**	(25,30% \pm 1,79%)	-----
MJM259	**	**	-----
MJM260	**	**	-----
MJM261	**	**	-----
MJM280	**	19,00 \pm 1,27	> 5,26 ^b
MJM324	45,97 \pm 3,11	0,17 \pm 0,01	270,41
Clorgilina	0,005 \pm 0,0009	63,41 \pm 1,20	0,000082
R-(-)-deprenilo	68,73 \pm 4,21	0,017 \pm 0,002	4043
Iproniazida	6,56 \pm 0,76	7,54 \pm 0,36	0,87

Cada valor de CI_{50} es la media \pm e.e.m. de 5 experimentos (n=5). ** Inactivo a 100 μM (mayor concentración estudiada, inhibición menor al 20%). A concentraciones superiores, los compuestos precipitan. ^aÍndice de selectividad MAO-B = [CI_{50} (MAO-A) / CI_{50} (MAO-B)]. ^bValor calculado considerando como CI_{50} frente a la MAO-B la mayor concentración estudiada (100 μM).

En relación a los sustituyentes estudiados sobre el núcleo de cumarina de esta serie de derivados, la presencia de un grupo hidroxilo en posición 4 de la cumarina, conduce a una pérdida de actividad, originando derivados que en la mayoría de los casos son inactivos frente a ambas isoformas; excepto para 3-(3',4',5'-trimetoxibenzamido)cumarina (MJM223) para el cual esta sustitución condujo al derivado MJM229 que es 2 veces más potente. Por otra parte, la presencia de un sustituyente metilo en posición 6 de la cumarina, conduce a un incremento significativo de la actividad, originando el derivado más potente de la serie (MJM324). MJM324

resultó 47 veces más potente como IMAO-B que **MJM249**, siendo además el único derivado de la serie que presenta actividad sobre la MAO-A.

5.1.6. Actividad inhibidora sobre las isoformas de la enzima MAO de los derivados de 3-ciclohexilamidocumarina y 3-heteroarilamidocumarina

Se estudió el resultado sobre la actividad inhibidora de la MAO de intercambiar el grupo benzamido de la posición 3 de la cumarina (serie descrita previamente) por un grupo ciclohexilamido o heteroarilamido. En la **Tabla 23**, se observa que ambos tipos de sustituciones conducen a una disminución de la actividad como IMAO respecto a la actividad presentada por la 3-benzamidocumarina (**MJM246**).

Tabla 23. Valores de CI_{50} o % de inhibición a concentración 100 μM (valor recogido entre paréntesis) de los compuestos estudiados e inhibidores de referencia sobre la actividad enzimática de las isoformas de la MAO, presentes en la fracción microsomal preparada a partir de células de insectos (BTI-TN-5B1-4) infectadas con baculovirus que contienen insertos de ADN responsables de la biosíntesis de la MAO-A o MAO-B humanas.

COMPUESTO	CI_{50} hMAO-A (μM) (% inhibición a 100 μM)	CI_{50} hMAO-B (μM) (% inhibición a 100 μM)	Índice de Selectividad ^a (IS)
MJM195	**	49,96 \pm 3,35	> 2,00 ^b
MJM197	**	22,47 \pm 1,51	> 4,45 ^b
MJM296	**	2,27 \pm 0,15	> 44,05 ^b
MJM297	**	15,50 \pm 1,04	> 6,45 ^b
MJM312	**	(51,95% \pm 3,48%)	-----
MJM313	**	(58,74% \pm 3,94%)	-----
MJM320	**	21,11 \pm 1,42	> 4,74 ^b
MJM321	**	(23,20% \pm 1,56%)	-----
Clorgilina	0,005 \pm 0,0009	63,41 \pm 1,20	0,000082
R-(-)-deprenilo	68,73 \pm 4,21	0,017 \pm 0,002	4043
Iproniazida	6,56 \pm 0,76	7,54 \pm 0,36	0,87

Cada valor de CI_{50} es la media \pm e.e.m. de 5 experimentos (n=5). ** Inactivo a 100 μM (mayor concentración estudiada, inhibición menor al 20%). A concentraciones superiores, los compuestos precipitan. ^aÍndice de selectividad MAO-B = [CI_{50} (MAO-A) / CI_{50} (MAO-B)]. ^bValor calculado considerando como CI_{50} frente a la MAO-B la mayor concentración estudiada (100 μM).

Entre los derivados estudiados, la presencia del grupo tiofen-2-il (**MJM296**), resultó más favorable para la actividad inhibidora de MAO-B, seguida de los grupos piridin-3-il (**MJM320**), ciclohexil (**MJM195**) y furan-2-il (**MJM312**) que originó los derivados con menor actividad.

La introducción de un grupo hidroxilo en posición 4 de la 3-ciclohexilamidocumarina conduce a un incremento de la actividad MAO-B; **MJM197** es 2,22 veces más potente que **MJM195**. Por el contrario, para los derivados de 3-heteroarilamidocumarina, un grupo hidroxilo en posición 4, condujo en general a una pérdida de actividad sobre la MAO-B.

5.1.7. Actividad inhibidora sobre las isoformas de la enzima MAO de los derivados de 7-benzamido-4-metilcumarina

Como se observa en la **Tabla 24**, estos derivados presentan mayor actividad que las 3-benzamidocumarinas antes descritas. En lo relativo a la influencia sobre la actividad de la naturaleza de los sustituyentes sobre el grupo benzamido en la posición 7 del núcleo de cumarina, se encontraron resultados similares a los obtenidos para las 3-benzamidocumarinas.

Tabla 24. Valores de CI_{50} o % de inhibición a concentración 100 μM (valor recogido entre paréntesis) de los compuestos estudiados e inhibidores de referencia sobre la actividad enzimática de las isoformas de la MAO, presentes en la fracción microsomal preparada a partir de células de insectos (BTI-TN-5B1-4) infectadas con baculovirus que contienen insertos de ADN responsables de la biosíntesis de la MAO-A o MAO-B humanas.

COMPUESTO	CI_{50} hMAO-A (μM) (% inhibición a 100 μM)	CI_{50} hMAO-B (μM) (% inhibición a 100 μM)	Índice de Selectividad ^a (IS)
MJM272	**	$0,36 \pm 0,02$	$> 278^b$
MJM273	**	(29,26% \pm 1,96%)	----
MJM275	**	$0,90 \pm 0,06$	$> 111,36^b$
MJM276	**	(52,74% \pm 3,54%)	----
MJM277	**	$0,31 \pm 0,02$	$> 320,51^b$
MJM279	**	(26,04% \pm 1,75%)	----
Clorgilina	$0,005 \pm 0,0009$	$63,41 \pm 1,20$	0,000082
R-(-)-deprenilo	$68,73 \pm 4,21$	$0,017 \pm 0,002$	4043
Iproniazida	$6,56 \pm 0,76$	$7,54 \pm 0,36$	0,87

Cada valor de CI_{50} es la media \pm e.e.m. de 5 experimentos (n=5). ** Inactivo a 100 μM (mayor concentración estudiada, inhibición menor al 20%). A concentraciones superiores, los compuestos precipitan. ^aÍndice de selectividad MAO-B = [CI_{50} (MAO-A) / CI_{50} (MAO-B)]. ^bValor calculado considerando como CI_{50} frente a la MAO-B la mayor concentración estudiada (100 μM).

Sin embargo, para estos derivados un incremento en el número de sustituyentes sobre el grupo benzamido parece incrementar ligeramente la actividad inhibidora de MAO B, 4-metil-7-(3',4'-dimetoxibenzamido)cumarina (**MJM276**) presentó mayor actividad que 4-metil-7-(4'-metoxibenzamido)cumarina (**MJM273**).

5.1.8. Actividad inhibidora sobre las isoformas de la enzima MAO de los derivados de 7-alquilamido-4-metilcumarina y 7-heteroarilamido-4-metilcumarina

Se estudió el efecto sobre la actividad inhibidora de las isoformas de la MAO de diferentes sustituyentes alquilamido (modificando la longitud de la cadena alquílica) o heteroarilamido (tiofen-2-ilamido y furan-2-ilamido) en posición 7 de la 4-metilcumarina.

Como se observa en la **Tabla 25**, la sustitución de la amida en posición 7 es necesaria para la actividad inhibidora de la MAO-B; 7-formamido-4-metilcumarina (**MJM286**) carece de actividad destacable sobre esta isoforma.

Un incremento en el número de átomos de carbono del sustituyente alquílico sobre la amida, conduce a un incremento de la actividad sobre la MAO-B, metil < etil < *iso*-propil < *terc*-butil, siendo 4-metil-7-*terc*butilamidocumarina (**MJM511**) el inhibidor MAO-B más potente y selectivo de esta serie. Además, los grupos *iso*-propil y *terc*-butil sobre la amida conducen a derivados más potentes que los heteroarilos tiofen-2-il (**MJM340**) o furan-2-il (**MJM341**).

En general, estos derivados también presentan actividad inhibidora sobre la isoforma MAO-A; sin embargo, no es posible establecer una relación entre el sustituyente alquilamida de la posición 7 y esta actividad. Con respecto a los derivados de 7-heteroaril-4-metilcumarina, 7-(furan-2-ilamido)-4-metilcumarina (**MJM341**) presenta una actividad similar sobre esta isoforma a 7-(etilamido)-4-metilcumarina (**MJM508**) mientras que 4-metil-7-(tiofen-2-ilamido)cumarina (**MJM340**) carece de actividad.

Tabla 25. Valores de CI_{50} o % de inhibición a concentración 100 μM (valor recogido entre paréntesis) de los compuestos estudiados e inhibidores de referencia sobre la actividad enzimática de las isoformas de la MAO, presentes en la fracción microsomal preparada a partir de células de insectos (*BTI-TN-5B1-4*) infectadas con baculovirus que contienen insertos de ADN responsables de la biosíntesis de la MAO-A o MAO-B humanas.

COMPUESTO	CI_{50} hMAO-A (μM) (% inhibición a 100 μM)	CI_{50} hMAO-B (μM) (% inhibición a 100 μM)	Índice de Selectividad ^a (IS)
MJM286	25,69 \pm 1,72	(38,81% \pm 2,60%)	<0,26 ^b
MJM430	96,65 \pm 6,53	(50,00% \pm 3,35%)	<0,97 ^b
MJM508	24,50 \pm 1,64	11,55 \pm 0,78	2,12
MJM509	45,86 \pm 10,25	0,44 \pm 0,03	102,82
MJM511	(41,08% \pm 2,76%)	0,25 \pm 0,02	>406,50 ^b

COMPUESTO	CI_{50} hMAO-A (μM) (% inhibición a 100 μM)	CI_{50} hMAO-B (μM) (% inhibición a 100 μM)	Índice de Selectividad ^a (IS)
MJM340	**	1,59 \pm 0,11	>62,89 ^b
MJM341	30,14 \pm 2,03	5,01 \pm 0,34	6,02
Clorgilina	0,005 \pm 0,0009	63,41 \pm 1,20	0,000082
R-(-)-deprenilo	68,73 \pm 4,21	0,017 \pm 0,002	4043
Iproniazida	6,56 \pm 0,76	7,54 \pm 0,36	0,87

Cada valor de CI_{50} es la media \pm e.e.m. de 5 experimentos (n=5). ** Inactivo a 100 μM (mayor concentración estudiada, inhibición menor al 20%). A concentraciones superiores, los compuestos precipitan. ^aÍndice de selectividad MAO-B = [CI_{50} (MAO-A) / CI_{50} (MAO-B)]. ^bValor calculado considerando como CI_{50} frente a la MAO-B la mayor concentración estudiada (100 μM).

5.1.9. Actividad inhibidora sobre las isoformas de la enzima MAO de 4,4'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)bis(7,8-dihidroxicumarina) (A1A)

A1A es un análogo híbrido curcumina-cumarina que posee una actividad inhibidora similar sobre ambas isoformas de la MAO pero que, como se puede ver en la **Tabla 26**, resultó ser menos potente que la curcumina y menos selectivo sobre la MAO-B

Tabla 26. Valores de CI_{50} o % de inhibición a concentración 100 μM (valor recogido entre paréntesis) de los compuestos estudiados e inhibidores de referencia sobre la actividad enzimática de las isoformas de la MAO, presentes en la fracción microsomal preparada a partir de células de insectos (BTI-TN-5B1-4) infectadas con baculovirus que contienen insertos de ADN responsables de la biosíntesis de la MAO-A o MAO-B humanas.

COMPUESTO	CI_{50} hMAO-A (μM) (% inhibición a 100 μM)	CI_{50} hMAO-B (μM) (% inhibición a 100 μM)	Índice de Selectividad ^a (IS)
A1A	27,05 \pm 1,82	29,19 \pm 1,96	0,93
Curcumina	10,18 \pm 0,68	1,78 \pm 0,12	5,719
Clorgilina	0,005 \pm 0,0009	63,41 \pm 1,20	0,000082
R-(-)-deprenilo	68,73 \pm 4,21	0,017 \pm 0,002	4043
Iproniazida	6,56 \pm 0,76	7,54 \pm 0,36	0,87

Cada valor de CI_{50} es la media \pm e.e.m. de 5 experimentos (n=5). ^aÍndice de selectividad MAO-B = [CI_{50} (MAO-A) / CI_{50} (MAO-B)].

5.1.10. Actividad inhibidora sobre las isoformas de la enzima MAO de los derivados de 3-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina.

Se estudió el efecto sobre la actividad inhibidora de ambas isoformas de la MAO de la presencia de 2 grupos hidroxilo en diferentes posiciones del núcleo de cumarina y 3 grupos hidroxilo en diferentes posiciones del sustituyente fenilo (**Tabla 27**).

Tabla 27. Valores de CI_{50} o % de inhibición a concentración 100 μM (valor recogido entre paréntesis) de los compuestos estudiados e inhibidores de referencia sobre la actividad enzimática de las isoformas de la MAO, presentes en la fracción microsomal preparada a partir de células de insectos (BTI-TN-5B1-4) infectadas con baculovirus que contienen insertos de ADN responsables de la biosíntesis de la MAO-A o MAO-B humanas.

COMPUESTO	CI_{50} hMAO-A (μM) (% inhibición a 100 μM)	CI_{50} hMAO-B (μM) (% inhibición a 100 μM)	Índice de Selectividad ^a (IS)
H1i5	(60,91% \pm 4,09%)	(45,76% \pm 3,07%)	- - - - -
H1J4	(54,33% \pm 3,64%)	(45,81% \pm 3,07%)	- - - - -
H1K5	(58,18% \pm 3,90%)	26,18 \pm 1,76	>3,82 ^b
H1L3	(51,50% \pm 3,45%)	(55,72% \pm 3,74%)	- - - - -
Curcumina	10,18 \pm 0,68	1,78 \pm 0,12	5,719
Clorgilina	0,005 \pm 0,0009	63,41 \pm 1,20	0,000082
R-(-)-deprenilo	68,73 \pm 4,21	0,017 \pm 0,002	4043
Iproniazida	6,56 \pm 0,76	7,54 \pm 0,36	0,87

Cada valor de CI_{50} es la media \pm e.e.m. de 5 experimentos (n=5). ^aÍndice de selectividad MAO-B = [CI_{50} (MAO-A) / CI_{50} (MAO-B)]. ^bValor calculado considerando como CI_{50} frente a la MAO-B la mayor concentración estudiada (100 μM).

Los derivados **H1K5** y **H1L3** con sustituyentes hidroxilo en posiciones 6 y 7 del núcleo de cumarina presentaron una mayor actividad inhibidora sobre la isoforma B de la MAO que los correspondientes derivados **H1i5** y **H1J4** en los que estos sustituyentes se localizan en posiciones 7 y 8 del núcleo de cumarina.

Sin embargo, la posición de los grupos hidroxilo sobre el núcleo de cumarina, no parece afectar a la actividad de estos derivados sobre la MAO-A.

5.1.11. Actividad inhibidora sobre las isoformas de la enzima MAO de los derivados de 4-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina

Como se puede ver en la **Tabla 28**, estos derivados en los que el sustituyente 7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il se sitúa en la posición 4 del núcleo de cumarina resultaron ser inhibidores más potentes sobre ambas isoformas de la MAO que los descritos anteriormente, para los que este sustituyente se sitúa en la posición 3 (**Tabla 27**).

Se estudió cómo afecta a la actividad inhibidora de la MAO la posición de los sustituyentes hidroxilo tanto sobre el sustituyente fenilo como sobre el núcleo de cumarina de estos derivados.

Tabla 28. Valores de CI_{50} o % de inhibición a concentración 100 μ M (valor recogido entre paréntesis) de los compuestos estudiados e inhibidores de referencia sobre la actividad enzimática de las isoformas de la MAO, presentes en la fracción microsomal preparada a partir de células de insectos (BTI-TN-5B1-4) infectadas con baculovirus que contienen insertos de ADN responsables de la biosíntesis de la MAO-A o MAO-B humanas.

COMPUESTO	CI_{50} hMAO-A (μ M) (% inhibición a 100 μ M)	CI_{50} hMAO-B (μ M) (% inhibición a 100 μ M)	Índice de Selectividad ^a (IS)
A1I	16,79 \pm 1,13	16,30 \pm 1,09	1,03
A1K	4,72 \pm 0,32	6,31 \pm 0,42	0,75
A1L	2,75 \pm 0,18	4,63 \pm 0,31	0,59
B1I	16,44 \pm 1,10	25,95 \pm 1,74	0,63
B1L	17,30 \pm 1,16	(55,63% \pm 3,73%)	<1,73 ^b
I1I	14,47 \pm 0,97	(40,60% \pm 2,72%)	<0,14 ^b
Curcumina	10,18 \pm 0,68	1,78 \pm 0,12	5,719
Clorgilina	0,005 \pm 0,0009	63,41 \pm 1,20	0,000082
R-(-)-deprenilo	68,73 \pm 4,21	0,017 \pm 0,002	4043
lproniazida	6,56 \pm 0,76	7,54 \pm 0,36	0,87

Cada valor de CI_{50} es la media \pm e.e.m. de 5 experimentos (n=5). ** Inactivo a 100 μ M (mayor concentración estudiada, inhibición menor al 20%). A concentraciones superiores, los compuestos precipitan. ^aÍndice de selectividad MAO-B = [CI_{50} (MAO-A) / CI_{50} (MAO-B)]. ^bValor calculado considerando como CI_{50} frente a la MAO-B la mayor concentración estudiada (100 μ M).

En general, se observa que cuando los sustituyentes hidroxilo ocupan las posiciones 7 y 8 sobre el núcleo de cumarina, los derivados presentan una mayor actividad sobre ambas isoformas de la MAO que aquellos en los que estos sustituyentes están en posiciones 6 y 7. Así, 7,8-dihidroxi-4-[7-(3',4',5'-trihidroxifenil)-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il]cumarina (**A1L**) resultó ser el derivado más potente de la serie tanto sobre MAO-A como sobre MAO-B y **A1I** y **A1L** resultaron ser inhibidores más potentes que los correspondientes derivados **B1I** y **B1L**, mientras que **A1I** y **B1I** presentaron una actividad similar sobre la isoforma A. En referencia a la posición de los sustituyentes hidroxilo sobre el sustituyente fenilo, su influencia en la actividad inhibidora de la MAO va a estar condicionada por la posición de los grupos hidroxilo sobre el núcleo de cumarina. Además, se observa que la introducción de un residuo aminoacídico sobre el anillo de fenilo (**I1I**) conduce a una disminución de la actividad sobre la MAO-B.

5.1.12. Reversibilidad de la inhibición de la MAO-B

Se seleccionaron algunos de los derivados de cumarina más potentes como inhibidores de MAO-B, correspondientes a las distintas series estudiadas, para conocer el modo en el cual ejercen la inhibición de la enzima (inhibición reversible o irreversible).

Como se observa en la **Tabla 29**, todos los derivados estudiados resultaron ser inhibidores reversibles; sin embargo, el grado de reversibilidad fue en todos los casos inferior al presentado por la isatina, un inhibidor reversible de la MAO-B utilizado como referencia.

Tabla 29. Resultados de reversibilidad de la inhibición de hMAO-B para los derivados seleccionados e inhibidores de referencia. ^[a] Los valores representan la media \pm e.e.m. de $n = 2$ experimentos.

COMPUESTO	Pendiente ($\Delta U F / t$)[%] ^[a]
CUM10	56,50 \pm 3,79
CUM21	65,08 \pm 4,37
MJM197	31,99 \pm 2,15
MJM246	58,49 \pm 3,92
MJM277	59,30 \pm 3,98
MJM296	41,77 \pm 2,80
MJM320	62,42 \pm 4,19
MJM470	63,75 \pm 4,28
MC145	46,68 \pm 3,13
MC146	61,15 \pm 4,10
MC151	60,35 \pm 4,05
A1L	58,33 \pm 3,01
R-(-)-deprenilo	12,73 \pm 1,85
Isatina	88,63 \pm 5,90

3-Ciclohexilamido-4-hidroxycumarina (**MJM197**) presentó el menor porcentaje de reversibilidad de la inhibición de la MAO-B, aunque también para 3-(tiofen-2-ilamido)cumarina (**MJM296**) y 3-(6-bromopiridazin-3-il)-6-metoxicumarina (**MC145**) la inhibición de la actividad enzimática se revirtió en un valor inferior al 50%.

Por el contrario, 7-hidroxi-3-(3',5'-dimetoxifenil)cumarina **CUM21** resultó ser el inhibidor de la MAO-B más reversible entre los derivados de cumarina estudiados, revirtiendo la actividad enzimática en un 65% después de la dilución.

5.2. ACTIVIDAD INHIBIDORA SOBRE LAS ENZIMAS AChE Y BuChE DE LOS DERIVADOS DE CUMARINA

En nuestros experimentos y bajo nuestras condiciones experimentales, la AChE presentó una constante de Michaelis (K_m) de $35,27 \pm 3,35 \mu\text{M}$ y una velocidad de reacción máxima ($V_{\text{máx}}$) de $11,6 \pm 1,01 \text{ nmoles/min/mg}$ de proteína; por su parte, la BuChE mostró unos valores de K_m de $104,28 \pm 6,98 \mu\text{M}$ y $V_{\text{máx}}$ de $58,33 \pm 5,05 \text{ nmoles/min/mg}$ de proteína.

Los inhibidores de referencia y algunos de los compuestos estudiados inhibieron la actividad enzimática de una forma dependiente de la concentración. El agua Milli-Q® y el vehículo utilizado (DMSO) no tuvieron efecto farmacológico significativo en los ensayos.

Los valores de CI_{50} de los compuestos estudiados (incluyendo los inhibidores de referencia) o el % de inhibición a concentración $100 \mu\text{M}$ sobre la actividad enzimática de AChE y BuChE, se indican en las diferentes tablas que se muestran a continuación.

5.2.1. Actividad inhibidora sobre las enzimas AChE y BuChE de los derivados de 3-fenilcumarina

Los derivados 3-fenil-7-hidroxycumarina (**CUMIa**) y 3-fenil-5,7-dihidroxycumarina (**JLG9b**), a diferencia del resto de derivados de esta serie, carecen de sustituyentes sobre el fenilo de la posición 3; ambos presentan actividad sobre la enzima BuChE en el rango de concentración micromolar, como se puede observar en la **Tabla 30**. **CUMIa** con un único sustituyente hidroxilo localizado sobre el núcleo de cumarina, resultó el derivado de 3-fenilcumarina con mayor actividad sobre la BuChE.

En general, se observa que el incremento en el número de sustituyentes hidroxilo en estos derivados conduce a una pérdida de la actividad sobre la BuChE. Además, el replazo de los sustituyentes hidroxilo por metoxilo conduce igualmente a derivados inactivos sobre la BuChE. Ninguno de los derivados de esta serie presenta una inhibición destacable de la AChE.

Tabla 30. Valores de CI_{50} o % de inhibición a concentración 100 μM (datos recogidos entre paréntesis) de los compuestos estudiados e inhibidores de referencia sobre la actividad enzimática de la AChE y la BuChE.

COMPUESTO	AChE CI_{50} (μM) (% inhibición a 100 μM)	BuChE CI_{50} (μM) (% inhibición a 100 μM)
CUM9	**	**
CUM10	(23,20% \pm 1,56%)	**
CUM11	**	(38,95% \pm 2,61%)
CUM12	(20,98% \pm 1,41%)	(24,34% \pm 1,63%)
CUM21	**	**
CUM21C	(21,21% \pm 1,42%)	(32,05% \pm 2,15%)
CUM32	**	(28,82% \pm 1,93%)
CUM41	**	**
CUM51	**	**
CUM61	**	(31,90% \pm 2,14%)
CUM71	(36,28% \pm 2,43%)	(35,61% \pm 2,39%)
CUM81	(24,81% \pm 1,66%)	(32,99% \pm 2,21%)
CUM91	**	(24,60% \pm 1,65%)
CUMa	**	(44,44% \pm 2,98%)
CUMla	**	11,27 \pm 0,76
SMA1	**	(56,15% \pm 3,76%)
SMB1	**	(39,51% \pm 2,65%)
JLG5b	**	**
JLG9b	(24,95% \pm 1,67%)	25,68 \pm 1,72
JLG12b	**	(31,05% \pm 2,08%)
MJM43b	**	**
Tacrina	0,45 \pm 0,03	0,15 \pm 0,01
Eserina	0,12 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01

Cada valor de CI_{50} es la media \pm e.e.m. de 5 experimentos (n=5). ** Inactivo a 100 μM (mayor concentración estudiada, inhibición menor al 20%). A concentraciones superiores, los compuestos precipitan.

5.2.2. Actividad inhibidora sobre las enzimas AChE y BuChE de los derivados de 3-(tiofen-2-il)cumarina

Como se observa en la **Tabla 31**, 7-hidroxi-3-(tiofen-2-il)cumarina (**MJM451**) resultó ser el derivado con mayor actividad de esta serie, inhibiendo la BuChE en el rango de concentración micromolar. De igual forma que para los derivados de 3-fenilcumarina, la introducción de sustituyentes en este caso sobre el heteroarilo de la posición 3 de la cumarina, conduce a una pérdida de la actividad. Además, la posición 7 del núcleo de cumarina parece más favorable para la introducción de un grupo hidroxilo, puesto que cuando este se sitúa en posición 8 se produce una pérdida de actividad. Lo mismo ocurre al incrementar el número de sustituyentes hidroxilo sobre el núcleo de cumarina.

Por otra parte, ninguno de los derivados de esta serie presenta actividad destacable sobre la AChE.

Tabla 31. Valores de CI_{50} o % de inhibición a concentración 100 μ M (datos recogidos entre paréntesis) de los compuestos estudiados e inhibidores de referencia sobre la actividad enzimática de la AChE y la BuChE.

COMPUESTO	AChE CI_{50} (μ M) (% inhibición a 100 μ M)	BuChE CI_{50} (μ M) (% inhibición a 100 μ M)
MJM450	**	(52,40% \pm 3,52%)
MJM451	(31,21% \pm 2,09%)	13,06 \pm 0,88
MJM452	(29,59% \pm 1,98%)	(51,90% \pm 3,48%)
MJM465	(27,30% \pm 1,83%)	(36,77% \pm 2,47%)
MJM470	(28,94% \pm 1,94%)	**
MJM471	(24,18% \pm 1,62%)	**
Tacrina	0,45 \pm 0,03	0,15 \pm 0,01
Eserina	0,12 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01

Cada valor de CI_{50} es la media \pm e.e.m. de 5 experimentos (n=5). ** Inactivo a 100 μ M (mayor concentración estudiada, inhibición menor al 20%). A concentraciones superiores, los compuestos precipitan.

5.2.3 Actividad inhibidora sobre las enzimas AChE y BuChE de los derivados de 3-(6-oxo-1,6-dihidropiridazin-3-il)cumarina

Los derivados **MC85** y **MC86** no se pudieron evaluar sobre AChE y BuChE, pues precipitaron en el tampón fosfato utilizado en el experimento.

Para los derivados de la serie de 3-(6-oxo-1,6-dihidropiridazin-3-il)cumarina, evaluados a concentración 100 μ M, se observó que únicamente **MC80** y **MC81** mostraron una ligera actividad sobre la BuChE, inhibiendo su actividad en 36,60% \pm 2,46% y 32,77% \pm 2,20%, respectivamente.

Ninguno de los derivados de esta serie presentó actividad inhibidora de la AChE superior al 20%.

5.2.4 Actividad inhibidora sobre las enzimas AChE y BuChE de los derivados de 3-(piridazin-3-il)cumarina

Los derivados **MC82**, **MC99**, **MC101**, **MC102**, **MC103**, **MC106**, **MC107** y **MC108** no se pudieron evaluar como potenciales inhibidores de AChE y BuChE, pues precipitaron en el tampón fosfato utilizado en el experimento.

Como se observa en la **Tabla 32**, ninguno de los derivados de esta serie, mostró actividad inhibidora destacable ni sobre la AChE ni sobre la BuChE.

Tabla 32. Valores de CI_{50} o % de inhibición a concentración 100 μM (datos recogidos entre paréntesis) de los compuestos estudiados e inhibidores de referencia sobre la actividad enzimática de la AChE y la BuChE.

COMPUESTO	AChE CI_{50} (μM) (% inhibición a 100 μM)	BuChE CI_{50} (μM) (% inhibición a 100 μM)
MC93	**	**
MC100	**	**
MC104	(22,78% \pm 1,53%)	**
MC105	**	**
MC124	**	**
MC143	**	**
MC144	**	**
MC145	**	**
MC146	**	**
MC147	(27,87% \pm 1,87%)	**
MC148	**	**
MC149	**	(27,01% \pm 1,81%)
MC150	**	**
MC151	**	**
MC152	**	**
MC153	**	**
MC154	**	(30,46% \pm 2,04%)
MC155	(34,41% \pm 2,31%)	**
MC156	**	**
MC157	**	(20,16% \pm 1,35%)
MC158	**	**
MC159	**	**
Tacrina	0,45 \pm 0,03	0,15 \pm 0,01
Eserina	0,12 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01

Cada valor de CI_{50} es la media \pm e.e.m. de 5 experimentos (n=5). ** Inactivo a 100 μM (mayor concentración estudiada, inhibición menor al 20%). A concentraciones superiores, los compuestos precipitan.

5.2.5 Actividad inhibidora sobre las enzimas AChE y BuChE de los derivados de 3-benzamidocumarina

En la **Tabla 33** se observa que la presencia de sustituyentes sobre el anillo bencénico de la amida en posición 3 de la cumarina, es esencial para la actividad inhibidora de la AChE de estos derivados. 3-Benzamidocumarina (**MJM246**) y 3-benzamido-4-hidroxycumarina (**MJM256**) que carecen de estos sustituyentes resultaron inactivos. Los sustituyentes metilo, cloro o nitro en la posición *para* de este anillo

bencénico originaron derivados más potentes que el sustituyente metoxilo en la misma posición; así **MJM249**, **MJM253** y **MJM255** son inhibidores más potentes de AChE que **MJM247**. Además, la presencia de grupos metoxilo adicionales sobre el anillo bencénico de la amida condujo a una pérdida de actividad, **MJM247** es un inhibidor de AChE más potente que **MJM252** y **MJM223**.

Tabla 33. Valores de CI_{50} o % de inhibición a concentración 100 μM (datos recogidos entre paréntesis) de los compuestos estudiados e inhibidores de referencia sobre la actividad enzimática de la AChE y la BuChE.

COMPUESTO	AChE CI_{50} (μM) (% inhibición a 100 μM)	BuChE CI_{50} (μM) (% inhibición a 100 μM)
MJM223	(25,03% \pm 1,68%)	**
MJM229	**	**
MJM246	**	**
MJM247	69,47 \pm 4,66	**
MJM249	18,38 \pm 1,23	(29,73% \pm 1,99%)
MJM252	**	**
MJM253	18,71 \pm 1,26	**
MJM254	15,01 \pm 1,01	**
MJM255	12,89 \pm 0,86	**
MJM256	**	**
MJM257	**	**
MJM258	**	**
MJM259	**	**
MJM260	**	**
MJM261	**	**
MJM280	**	**
MJM324	41,37 \pm 2,80	(41,63% \pm 2,79%)
Tacrina	0,45 \pm 0,03	0,15 \pm 0,01
Eserina	0,12 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01

Cada valor de CI_{50} es la media \pm e.e.m. de 5 experimentos (n=5). ** Inactivo a 100 μM (mayor concentración estudiada, inhibición menor al 20%). A concentraciones superiores, los compuestos precipitan.

Un sustituyente hidroxilo en posición 4 del núcleo de cumarina conduce a una pérdida de la actividad inhibidora de la AChE como se puede comprobar al comparar los derivados **MJM257** vs **MJM247**, **MJM259** vs **MJM249**, **MJM260** vs **MJM253**, **MJM280** vs **MJM254** y **MJM261** vs **MJM255**.

La presencia de un sustituyente metilo en posición 7 del núcleo de cumarina, conduce también a una pérdida de actividad; así **MJM324** resultó 2,25 veces menos potente como inhibidor de AChE que **MJM249**.

Ninguno de los derivados de esta serie presentó una actividad inhibidora de BuChE destacable.

5.2.6 Actividad inhibidora sobre las enzimas AChE y BuChE de los derivados de 3-ciclohexilamidocumarina y 3-heteroarilamidocumarina

Los sustituyentes ciclohexilamido o heteroarilamido en posición 3 de la cumarina no parecen adecuados para obtener derivados con actividad inhibidora de ChE. Los derivados **MJM296**, **MJM313** y **MJM321**, que son los únicos de la serie con actividad inhibidora superior al 20% sobre AChE presentan heteroarilos de diferente naturaleza (tiofeno, furano o piridina), lo que indica que la naturaleza del heteroarilo tiene escasa influencia sobre su actividad (**Tabla 34**).

Tabla 34. Valores de CI_{50} o % de inhibición a concentración 100 μM (datos recogidos entre paréntesis) de los compuestos estudiados e inhibidores de referencia sobre la actividad enzimática de la AChE y la BuChE.

COMPUESTO	AChE CI_{50} (μM) (% inhibición a 100 μM)	BuChE CI_{50} (μM) (% inhibición a 100 μM)
MJM195	**	**
MJM197	**	**
MJM296	(38,69% \pm 2,60%)	**
MJM297	**	**
MJM312	**	**
MJM313	(25,41% \pm 1,70%)	**
MJM320	**	**
MJM321	(29,16% \pm 1,96%)	**
Tacrina	0,45 \pm 0,03	0,15 \pm 0,01
Eserina	0,12 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01

Cada valor de CI_{50} es la media \pm e.e.m. de 5 experimentos ($n=5$). ** Inactivo a 100 μM (mayor concentración estudiada, inhibición menor al 20%). A concentraciones superiores, los compuestos precipitan.

5.2.7 Actividad inhibidora sobre las enzimas AChE y BuChE de los derivados de 7-benzamido-4-metilcumarina

7-(4'-Clorobenzamido)-4-metilcumarina (**MJM277**) resultó ser el derivado con mayor actividad inhibidora de esta serie, presentando una $CI_{50} \approx 100 \mu\text{M}$ tanto sobre AChE como sobre BuChE. La sustitución en posición *para* de la benzamida con grupos metilo, metoxilo o nitro parece menos favorable para la actividad inhibidora de ChE, ya que estos derivados presentan una actividad similar o incluso inferior a la 7-benzamido-4-metilcumarina (**MJM272**) como se puede ver en la **Tabla 35**.

Tabla 35. Valores de CI_{50} o % de inhibición a concentración 100 μM (datos recogidos entre paréntesis) de los compuestos estudiados e inhibidores de referencia sobre la actividad enzimática de la AChE y la BuChE.

COMPUESTO	AChE CI_{50} (μM) (% inhibición a 100 μM)	BuChE CI_{50} (μM) (% inhibición a 100 μM)
MJM272	(21,44% \pm 1,44%)	(24,19% \pm 1,62)
MJM273	**	(27,20% \pm 1,82%)
MJM275	**	**
MJM276	**	**
MJM277	(46,22% \pm 3,10%)	(51,27% \pm 3,44%)
MJM279	(27,81% \pm 1,86%)	**
Tacrina	0,45 \pm 0,03	0,15 \pm 0,01
Eserina	0,12 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01

Cada valor de CI_{50} es la media \pm e.e.m. de 5 experimentos (n=5). ** Inactivo a 100 μM (mayor concentración estudiada, inhibición menor al 20%). A concentraciones superiores, los compuestos precipitan.

5.2.8 Actividad inhibidora sobre las enzimas AChE y BuChE de los derivados de 7-heteroarilimido-4-metilcumarina y 7-alquilamido-4-metilcumarina

El reemplazo del grupo benzamido de la posición 7 de la cumarina por un grupo heteroarilamido o alquilamido no contribuyó a la obtención de inhibidores más potentes de ChE.

Tabla 36. Valores de CI_{50} o % de inhibición a concentración 100 μM (datos recogidos entre paréntesis) de los compuestos estudiados e inhibidores de referencia sobre la actividad enzimática de la AChE y la BuChE.

COMPUESTO	AChE CI_{50} (μM) (% inhibición a 100 μM)	BuChE CI_{50} (μM) (% inhibición a 100 μM)
MJM286	**	(27,92% \pm 1,87%)
MJM340	(30,88% \pm 2,07%)	(38,03% \pm 2,55%)
MJM341	(23,63% \pm 1,58%)	(28,54% \pm 1,91%)
MJM430	**	(21,73% \pm 1,46%)
MJM508	**	(20,40% \pm 1,37%)
MJM509	**	**
MJM511	**	**
Tacrina	0,45 \pm 0,03	0,15 \pm 0,01
Eserina	0,12 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01

Cada valor de CI_{50} es la media \pm e.e.m. de 5 experimentos (n=5). ** Inactivo a 100 μM (mayor concentración estudiada, inhibición menor al 20%). A concentraciones superiores, los compuestos precipitan.

Si bien ninguno de los derivados de estas series mostró una marcada actividad inhibidora sobre AChE ni BuChE, en la **Tabla 36** se observa que los derivados de 7-alquilamidocumarina son más selectivos sobre la AChE mientras que los derivados de

7-heteroarilamidocumarina (**MJM340** y **MJM341**) presentan una actividad similar sobre AChE y BuChE.

5.2.9 Actividad inhibidora sobre las enzimas AChE y BuChE de 3,3'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina y de los derivados de 4,4'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina

Como se puede observar en la **Tabla 37**, 3,3'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina (**H1i2**) resultó ser el derivado con mayor actividad inhibidora de AChE y BuChE en estas series. A concentración 100 μM , presenta una actividad similar a la curcumina sobre la BuChE pero menor sobre la AChE. El cambio de posición del espaciador 3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil de la posición 3 de las cumarinas a la posición 4, conduce a una pérdida de la actividad.

Tabla 37. Valores de CI_{50} o % de inhibición a concentración 100 μM (datos recogidos entre paréntesis) de los compuestos estudiados e inhibidores de referencia sobre la actividad enzimática de la AChE y la BuChE.

COMPUESTO	AChE CI_{50} (μM) (% inhibición a 100 μM)	BuChE CI_{50} (μM) (% inhibición a 100 μM)
H1i2	(47,58% \pm 3,19%)	(39,44% \pm 2,64%)
A1A	**	(21,45% \pm 1,44%)
B1B	**	**
Curcumina	(64,83% \pm 4,34%)	(35,46% \pm 2,38%)
Tacrina	0,45 \pm 0,03	0,15 \pm 0,01
Eserina	0,12 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01

Cada valor de CI_{50} es la media \pm e.e.m. de 5 experimentos (n=5). ** Inactivo a 100 μM (mayor concentración estudiada, inhibición menor al 20%). A concentraciones superiores, los compuestos precipitan.

5.2.10 Actividad inhibidora sobre las enzimas AChE y BuChE de los derivados de 3-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina

Como se observa en la **Tabla 38**, los derivados **H1J2**, **H1K3** y **H1L2** presentan una actividad similar sobre AChE y BuChE, siendo su actividad sobre la AChE inferior a la presentada por la curcumina. **H1i5** resultó el derivado más selectivo con actividad sobre BuChE. Ninguno de los derivados mostró una marcada actividad sobre ninguna de las dos enzimas.

Tabla 38. Valores de CI_{50} o % de inhibición a concentración 100 μM (datos recogidos entre paréntesis) de los compuestos estudiados e inhibidores de referencia sobre la actividad enzimática de la AChE y la BuChE.

COMPUESTO	AChE CI_{50} (μM) (% inhibición a 100 μM)	BuChE CI_{50} (μM) (% inhibición a 100 μM)
H1i3	**	**
H1i5	**	(43,26% \pm 2,90%)
H1J2	(38,47% \pm 2,58%)	(36,08% \pm 2,42%)
H1J4	**	**
H1K3	(47,69% \pm 3,20%)	(50,94% \pm 3,41%)
H1K5	**	(21,37% \pm 1,43%)
H1L2	(42,88% \pm 2,87%)	(46,63% \pm 3,12%)
H1L3	**	**
Curcumina	(64,83% \pm 4,34%)	(35,46% \pm 2,38%)
Tacrina	0,45 \pm 0,03	0,15 \pm 0,01
Eserina	0,12 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01

Cada valor de CI_{50} es la media \pm e.e.m. de 5 experimentos (n=5). ** Inactivo a 100 μM (mayor concentración estudiada, inhibición menor al 20%). A concentraciones superiores, los compuestos precipitan.

5.2.11 Actividad inhibidora sobre las enzimas AChE y BuChE de los derivados de 4-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina

Ninguno de los derivados de esta serie, estudiados a concentración 100 μM , presentó un porcentaje de inhibición superior al 20 % sobre BuChE o AChE, por lo que estos derivados carecen de interés como inhibidores de ChEs.

5.3. ACTIVIDAD INHIBIDORA SOBRE LA ENZIMA BACE1 DE DERIVADOS DE CUMARINA

Se llevó a cabo un primer cribado de la actividad inhibidora de BACE1 de algunos compuestos, seleccionados en las distintas series estudiadas, que se consideraron representativos de las mismas. Los compuestos evaluados fueron:

- Los derivados de 3-fenilcumarina **CUM41**, **CUM21C**, **CUM71**, **CUMa** y **CUMIa**
- Los derivados de 3-(tiofen-2-il)cumarina **MJM451** y **MJM452**
- Los derivados de 3-(6-oxo-1,6-dihidropiridazin-3-il)cumarina **MC74**, **MC78** y **MC84**
- 3-(6-Metoxipiridazin-3-il)-6-metilcumarina (**MC93**)
- Los derivados de 3-benzamidocumarina **MJM246** y **MJM256**
- Los derivados de 3-heteroarilamidocumarina **MJM296**, **MJM297**, **MJM312**, **MJM313**, **MJM320**, **MJM321**
- 7-Benzamido-4-metilcumarina (**MJM272**)
- 7-Acetamido-4-metilcumarina (**MJM430**)
- 4-Metil-7-(tiofen-2-ilamido)cumarina (**MJM340**)
- 3,3'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina (**H1i2**)
- Los derivados de 3-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina **H1J4** y **H1K3**

Únicamente los derivados **CUM71**, **MJM340** y **MC78** inhibieron la actividad de la enzima BACE1 en un porcentaje superior al 20% cuando fueron evaluados utilizando una concentración 100 μ M de los mismos. Para estos derivados se obtuvieron los valores de CI_{50} que se presentan en la **Tabla 39**.

Posteriormente se llevó a cabo un segundo cribado evaluando la actividad inhibidora de BACE1 de otros derivados correspondientes a las mismas series que aquellos que habían presentado actividad. Se evaluaron entonces:

- Los derivados de 3-fenilcumarina **CUM11**, **CUM21**, **CUM81** y **SMA1**
- Los derivados de 3-(6-oxo-1,6-dihidropiridazin-3-il)cumarina **MC91**, **MC96**, **MC97** y **MC98**
- 7-(Furan-2-ilamido)-4-metilcumarina (**MJM341**)

Desafortunadamente, en el segundo cribado ninguno de los derivados de cumarina evaluados mostró una actividad inhibidora de BACE1 destacable. Los compuestos **MC93** y **MC100** inhibieron la actividad enzimática entre el 20-25 %, utilizando una concentración 100 μM de los mismos.

Los resultados obtenidos no permitieron establecer una relación entre su estructura y la actividad inhibidora de BACE1.

Tabla 39. Valores de CI_{50} de los compuestos estudiados e inhibidor de referencia sobre la actividad enzimática de la BACE1. Cada valor de CI_{50} es la media \pm e.e.m. de 3 experimentos (n=3).

COMPUESTO	BACE1 CI_{50} (μM)
CUM71	54,39 \pm 3,65
MJM340	34,49 \pm 2,31
MC78	65,22 \pm 4,38
OM99-2	0,08 ⁴¹³ \pm 0,002

5.4. ACTIVIDAD INHIBIDORA SOBRE LA ENZIMA COX-1 DE DERIVADOS DE CUMARINA

Se evaluó la posible actividad inhibidora de COX-1 de los derivados de 3-fenilcumarina, de los derivados de 4,4'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina), de los derivados de 3-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina y 4-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina descritos en la **Tabla 2**, **Tabla 12**, **Tabla 13** y **Tabla 14** respectivamente.

Para algunos de los derivados de 3-fenilcumarina se evaluó además su actividad sobre la isoforma COX-2.

El agua Milli-Q® y el DMSO utilizados como vehículo no tuvieron efecto farmacológico significativo en los experimentos.

5.4.1. Actividad inhibidora sobre la enzima COX de los derivados de 3-fenilcumarina

En general, aquellos derivados que presentan 3 ó más grupos hidroxilo en su estructura inhibieron la COX-1, excepto **CUM21C**, **CUM91** y **JLG5b** que resultaron inactivos.

En la **Tabla 40** se observa que 3-(3',4',5'-trihidroxifenil)cumarina (**SMA1**) resultó ser el mejor inhibidor de COX-1 de esta serie, con una potencia casi 6 veces mayor que la indometacina y 9 veces mayor que diclofenaco, dos fármacos utilizados como inhibidores de referencia. La sustitución de este derivado con grupos hidroxilo sobre el núcleo de cumarina, condujo a una disminución de la actividad. **SMA1** presenta mayor actividad que 6-hidroxi-3-(3',4',5'-trihidroxifenil)cumarina (**CUM11**) y 7-hidroxi-3-(3',4',5'-trihidroxifenil)cumarina (**CUM71**) y estos, mayor actividad que 6,8-dihidroxi-3-(3',4',5'-trihidroxifenil)cumarina (**CUM61**) y 6,7-dihidroxi-3-(3',4',5'-trihidroxifenil)cumarina (**SMB1**).

Por el contrario para aquellos derivados que presentan únicamente 1 ó 2 sustituyentes hidroxilo en posiciones *meta* o *para* sobre el fenilo de la posición 3 de la cumarina, el incremento de los sustituyentes hidroxilo sobre el núcleo de cumarina conduce a un incremento de la actividad. **CUM21C**, **CUM41**, **CUM81**, **CUM91**, **CUM1a** con un único sustituyente hidroxilo en el núcleo de cumarina resultaron

inactivos. Además es necesario que estos se localicen en posiciones alternas; 7,8-dihidroxi-3-(3',4'-dihidroxifenil)cumarina (**JLG5b**) es inactivo mientras 5,7-dihidroxi-3-(3',4'-dihidroxifenil)cumarina (**JLG12b**) presenta actividad.

Tabla 40. Valores de CI_{50} o % de inhibición a concentración 100 μM (datos recogidos entre paréntesis) de los compuestos estudiados e inhibidores de referencia sobre la actividad enzimática de las isoformas de la COX.

COMPUESTO	COX-1 CI_{50} (μM) (% inhibición a 100 μM)	COX-2 CI_{50} (μM) (% inhibición a 100 μM)
CUM9	**	ND
CUM10	**	ND
CUM11	18,30 \pm 2,70	16,4 \pm 1,10
CUM12	**	ND
CUM21	**	**
CUM21C	**	**
CUM32	20,20 \pm 1,36	(21,39% \pm 1,43%)
CUM41	**	**
CUM51	3,23 \pm 0,22	(25,89% \pm 1,73%)
CUM61	22,41 \pm 1,50	(66,50% \pm 4,46%)
CUM71	9,55 \pm 0,60	8,44 \pm 0,60
CUM81	**	**
CUM91	**	**
CUMa	**	**
CUM1a	**	(35,32% \pm 2,37%)
SMA1	2,04 \pm 0,14	3,68 \pm 0,25
SMB1	20,95 \pm 1,41	13,33 \pm 0,89
JLG5b	**	ND
JLG9b	25,95 \pm 1,74	ND
JLG12b	55,86 \pm 3,75	ND
MJM43b	**	ND
Indometacina	12,16 \pm 1,16	35,20 \pm 1,41
Diclofenaco	18,23 \pm 1,73	23,62 \pm 1,97

Cada valor de CI_{50} es la media \pm e.e.m. de 3 experimentos (n=3). ** Inactivo a 100 μM (mayor concentración estudiada, inhibición menor al 20%). A concentraciones superiores, los compuestos precipitan. ND: No determinado.

También se observa que la sustitución en posición *para* del fenilo en posición 3 de la cumarina es más desfavorable para la actividad que la sustitución en posición *meta*. 6,8-Dihidroxi-3-(3',5'-dihidroxifenil)cumarina (**CUM51**) presenta una elevada actividad, pero esta se reduce en 6,8-dihidroxi-3-(3',4',5'-trihidroxifenil)cumarina (**CUM61**) y 6,8-dihidroxi-3-(4'-hidroxifenil)cumarina (**CUM32**).

7-metoxi-3-(4-metoxifenil)cumarina (**CUM9**) resultó inactivo y el reemplazo de uno (**CUM10** y **CUM12**) o ambos (**CUM 41**) sustituyentes metoxilo por grupos hidroxilo, no mejoró su actividad. También **CUM21** y **MJM43b** que combinan sustituyentes hidroxilo en el núcleo de cumarina, con sustituyentes metoxilo en el fenilo en posición 3, resultaron inactivos.

Para algunos de los derivados se estudió también su actividad inhibidora de COX-2. Los tres derivados de 3-(3',4',5'-trihidroxifenil)cumarina, **SMA1**, **CUM11** y **CUM71**, presentan una actividad similar sobre ambas isoformas, siendo más potentes como inhibidores de la COX-2 que la indometacina o el diclorofenaco. **CUM51** carece de actividad inhibidora de la COX-2, siendo por tanto un inhibidor potente y selectivo de la isoforma COX-1.

5.4.2. Actividad inhibidora sobre la enzima COX-1 de los derivados de 4,4'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina

Como se observa en la **Tabla 41**, la presencia de grupos hidroxilo en posiciones 6 y 7 de los núcleos de cumarina (**B1B**) originó un derivado con mayor actividad sobre COX-1 que su localización en posiciones 7 y 8 (**A1A**).

Tabla 41. Valores de CI_{50} o % de inhibición a concentración 100 μM (datos recogidos entre paréntesis) de los compuestos estudiados e inhibidores de referencia sobre la actividad enzimática de la COX-1.

COMPUESTO	COX-1 CI_{50} (μM) (% inhibición a 100 μM)
A1A	**
B1B	(42,54% \pm 2,85%)
Indometacina	12,16 \pm 1,16
Diclofenaco	18,23 \pm 1,73

Cada valor de CI_{50} es la media \pm e.e.m. de 3 experimentos (n=3). ** Inactivo a 100 μM (mayor concentración estudiada, inhibición menor al 20%). A concentraciones superiores, los compuestos precipitan.

5.4.3. Actividad inhibidora sobre la enzima COX-1 de los derivados 3-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina y 4-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina

Ninguno de los derivados de 3-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina inhibió, a una concentración de 100 μM , la actividad enzimática de la COX-1 en un

porcentaje superior al 20 %. Sin embargo, el cambio del sustituyente 7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il de la posición 3 a la posición 4 de la cumarina, originó derivados que, en su mayoría, presentaron actividad.

Para los derivados **B1K**, **J1J** y **K1K**, a pesar de que presentan un elevado porcentaje de inhibición de la actividad enzimática cuando son evaluados a concentración 100 μM (**Tabla 42**), una pequeña reducción de la concentración supuso la pérdida de su actividad.

Tabla 42. Valores de CI_{50} o % de inhibición a concentración 100 μM (datos recogidos entre paréntesis) de los compuestos estudiados e inhibidores de referencia sobre la actividad enzimática de la COX-1.

COMPUESTO	COX-1 CI_{50} (μM) (% inhibición a 100 μM)
A1I	(29,30 \pm 1,96%)
A1J	18,87 \pm 1,27
A1K	**
A1L	62,60 \pm 4,19
B1I	(45,33 \pm 3,04%)
B1K	(64,39% \pm 4,31%)
B1L	(45,17 \pm 3,03%)
I1I	34,33 \pm 2,30
J1J	(65,16 \pm 4,37%)
K1K	(73,63% \pm 4,93%)
L1L	43,47 \pm 2,91
Indometacina	12,16 \pm 1,16
Diclofenaco	18,23 \pm 1,73

Cada valor de CI_{50} es la media \pm e.e.m. de 3 experimentos (n=3). ** Inactivo a 100 μM (mayor concentración estudiada, inhibición menor al 20%). A concentraciones superiores, los compuestos precipitan.

En general, la sustitución de al menos una de las posiciones *meta* del fenilo unido a la cadena alquímica, favorece la actividad inhibidora de COX-1. **A1I** y **B1I** que no presentan esta sustitución fueron dos de los derivados que presentaron menor actividad.

Los dos derivados más potentes de la serie (**A1J** y **I1I**), presentan dos sustituyentes hidroxilo en posiciones 7 y 8 del núcleo de cumarina, mientras que los tres sustituyentes sobre el fenilo unido a la cadena alquímica están en posiciones *orto*, *meta* y *para*. El derivado **A1J** presenta tres grupos hidroxilos mientras que en **I1I**, el hidroxilo en *orto* es sustituido por un residuo aminoacídico, reduciéndose su actividad.

Todos los derivados con residuos aminoacídicos en su molécula (**I1I**, **J1J**, **K1K** y **L1L**), presentaron actividad inhibidora de COX-1.

La influencia sobre la actividad de las posiciones que ocupan los sustituyentes hidroxilo sobre el núcleo de cumarina (6 y 7 ó 7 y 8) depende de la naturaleza y localización de los sustituyentes sobre el fenilo unido a la cadena alquílica.



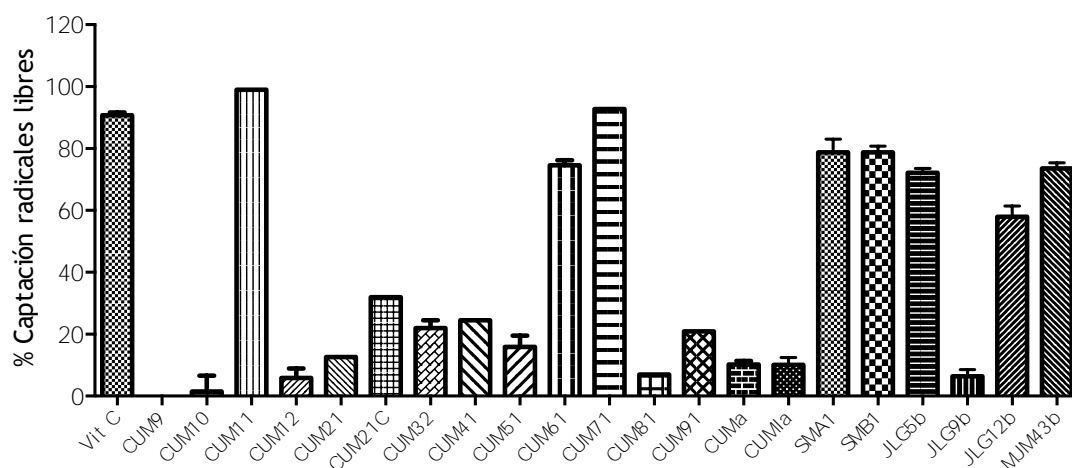
5.5. CAPACIDAD DE NEUTRALIZACIÓN DE RADICALES LIBRES DE LOS DERIVADOS DE CUMARINA

Se evaluó la serie completa de los derivados de 3-fenilcumarina, 3-(tiofen-2-il)cumarina, algunos derivados seleccionados con estructura de 3-piridazinilcumarina, 3-amidocumarina y 7-amidocumarina y las distintas series de análogos híbridos cumarina-curcumina.

Se hizo un cribado inicial estudiando la actividad de estos derivados a concentración 100 μ M, obteniendo los resultados que se muestran en las **Gráficas 1-5**. Para aquellos derivados que, a esta concentración, presentaron un porcentaje elevado de captación de radicales libres, se estudió su actividad a diferentes concentraciones para obtener las CE_{50} que se muestran en las **Tablas 43-46**.

Los derivados **MJM312** y **MJM320** no pudieron ser evaluados puesto que reaccionaron con el reactivo utilizado (DPPH $^{\bullet}$).

5.5.1. Capacidad de neutralización de radicales libres de los derivados de 3-fenilcumarina



Gráfica 1. Porcentaje de neutralización del radical DPPH por los derivados de 3-fenilcumarina (100 μ M) y la vitamina C utilizada como referencia (100 μ M). Cada valor de % de captación es la media \pm e.e.m. de 3 experimentos ($n=3$).

En la **Gráfica 1** se observa que los derivados **CUM11**, **CUM61**, **CUM71**, **SMA1**, **SMB1**, **JLG12b**, **JLG5b** y **MJM43b**, a concentración 100 μ M, poseen una alta actividad secuestradora del radical DPPH $^{\bullet}$. Los porcentajes de neutralización estuvieron comprendidos entre el 60-99%, mostrando muchos de ellos valores similares o

superiores a la vitamina C (fármaco de referencia). Sus valores de CE_{50} se detallan en la **Tabla 43**.

Tabla 43. CE_{50} de los derivados de 3-fenilcumarina con mayor actividad secuestradora del radical DPPH[•] y de la vitamina C (fármaco de referencia). Cada valor de CE_{50} es la media \pm e.e.m. de 3 experimentos (n=3).

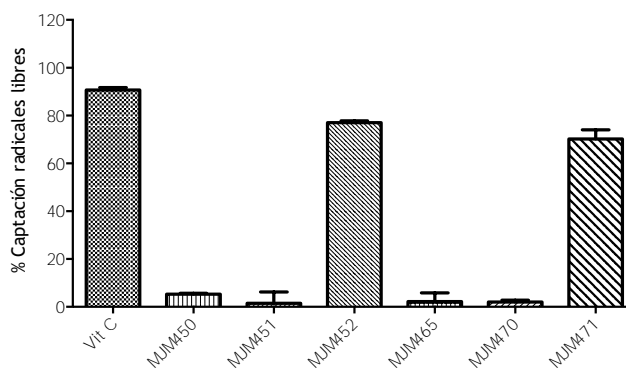
COMPUESTO	CE_{50} (μ M)
CUM11	2,96 \pm 0,20
CUM61	42,45 \pm 2,84
CUM71	4,10 \pm 0,27
SMA1	5,46 \pm 0,37
SMB1	2,59 \pm 0,17
JLG5b	2,83 \pm 0,19
JLG12b	18,72 \pm 1,25
MJM43b	5,98 \pm 0,40
Vitamina C	5,02 \pm 0,34

Estudiando la relación entre la estructura química de estos derivados y su actividad, se observa que los derivados más potentes son aquellos que presentan en su estructura dos o tres grupos hidroxilo en posiciones contiguas bien sobre el fenilo de la posición 3 o sobre el núcleo de cumarina.

La presencia de sustituyentes hidroxilo sobre la estructura de 3-fenilcumarina es necesaria para la actividad. **CUM9**, el único derivado que carece de grupos hidroxilo, es el único de la serie que no presenta ninguna actividad. Aunque la actividad se incrementa al aumentar estos sustituyentes, es más importante la posición que estos ocupan, como se comentó previamente.

5.5.2. Capacidad de neutralización de radicales libres de los derivados de 3-(tiofen-2-il)cumarina

De igual forma que se describió para los derivados de 3-fenilcumarina, los derivados de 3-(tiofen-2-il)cumarina que presentan grupos hidroxilo en posiciones contiguas del núcleo de cumarina, **MJM452** y **MJM471**, fueron los que presentaron mayor actividad (**Gráfica 2**). Los valores de CE_{50} para estos derivados aparecen en la **Tabla 44**.



Gráfica 2. Porcentaje de neutralización del radical DPPH por los derivados de 3-(tiofen-2-il)cumarina (100 μ M) y la vitamina C utilizada como referencia (100 μ M). Cada valor de % de captación es la media \pm e.e.m. de 3 experimentos ($n=3$).

Tabla 44. CE_{50} de los derivados de 3-(tiofen-2-il)cumarina con mayor actividad secuestradora del radical DPPH $^{\bullet}$ y la vitamina C (fármaco de referencia). Cada valor de CE_{50} es la media \pm e.e.m. de 3 experimentos ($n=3$).

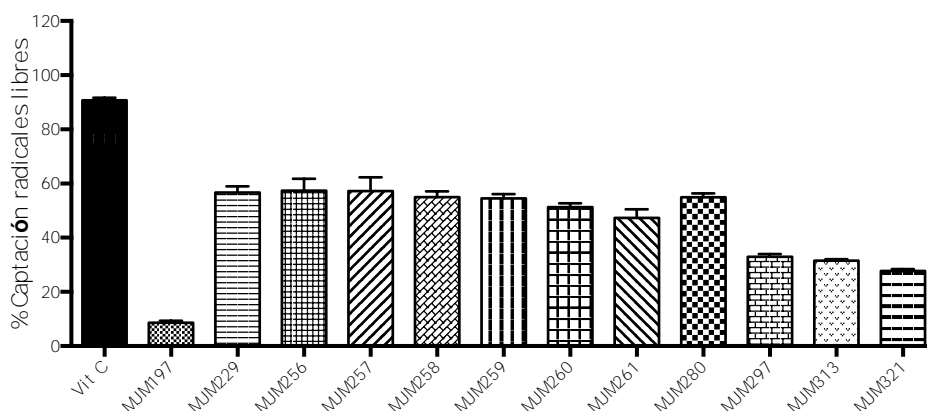
COMPUESTO	CE_{50} (μ M)
MJM452	$9,20 \pm 0,62$
MJM471	$5,82 \pm 0,39$
Vitamina C	$5,02 \pm 0,34$

5.5.3. Capacidad de neutralización de radicales libres de los derivados de 3-(6-oxo-1,6-dihidropiridazin-3-il)cumarina y 3-(piridazin-3-il)cumarina

Se realizó un cribado preliminar de los derivados de estas series evaluando la actividad de MC78, MC99, MC100, MC101, MC105, MC107, MC149, MC151, MC152 y MC157. Todos ellos resultaron totalmente inactivos.

5.5.4. Capacidad de neutralización de radicales libres de los derivados de 3-benzamido-4-hidroxycumarina, 3-ciclohexilamido-4-hidroxycumarina y 3-heteroarilamido-4-hidroxycumarina

Los mejores resultados corresponden a los derivados de 3-benzamido-4-hidroxycumarina (**Gráfica 3**). La sustitución del anillo bencénico por tiofeno (**MJM297**), furano (**MJM313**) o piridina (**MJM321**) condujo a una disminución de la actividad. El derivado 3-ciclohexilamido-4-hidroxycumarina (**MJM 197**) resultó el menos activo a concentración 100 μ M.



Gráfica 3. Porcentaje de neutralización del radical DPPH por los derivados de 3-benzamido-4-hidroxicumarina, 3-ciclohexilamido-4-hidroxicumarina y 3-heteroarilamido-4-hidroxicumarina (100 μ M) y la vitamina C utilizada como referencia (100 μ M). Cada valor de % de captación es la media \pm e.e.m. de 3 experimentos ($n=3$).

5.5.5. Capacidad de neutralización de radicales libres de los derivados de 7-benzamido-4-metilcumarina, 7-alquilamido-4-metilcumarina y 7-heteroarilamido-4-metilcumarina

Se seleccionaron para el cribado preliminar los derivados **MJM276**, **MJM340** y **MJM341** que fueron evaluados a concentración 100 μ M. Todos ellos, que carecen de grupos hidroxilo en su estructura, resultaron inactivos.

5.5.6. Capacidad de neutralización de radicales libres de los derivados de 3,3'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina y 4,4'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina

H1i2, **A1A** y **B1B** presentan el mismo número de grupos hidroxilo en su estructura; sin embargo, mientras **B1B**, en el que los grupos hidroxilo se encuentran en posiciones 6 y 7 de los núcleos de cumarina, presenta cierta actividad, **H1i2** y **A1A** donde ocupan las posiciones 7 y 8, resultaron inactivos (**Tabla 45**).

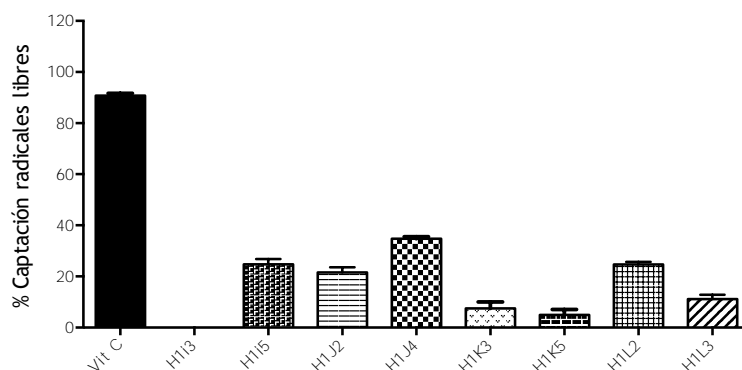
Tabla 45. Porcentaje de neutralización del radical DPPH por los derivados de 3,3'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina y 4,4'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina y la vitamina C (fármaco de referencia), todos ellos a concentración 100 μ M. Cada valor de % de captación es la media \pm e.e.m. de 3 experimentos ($n=3$).

COMPUESTO	CAPTACIÓN DE RADICALES LIBRES (en % de neutralización de DPPH)
H1i2	**
A1A	**
B1B	31,03% \pm 2,08%
Vitamina C	89,47% \pm 5,99%

** Inactivo a 100 μ M (mayor concentración estudiada). A concentraciones superiores, los compuestos precipitan.

5.5.7. Capacidad de neutralización de radicales libres de los derivados de 3-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina

Como se observa en la **Gráfica 4**, estos derivados presentan una actividad moderada o nula como secuestradores de radicales libres. En general, los derivados con mayor actividad son los que presentan tres grupos hidroxilo en posiciones contiguas del sustituyente fenilo. **H1i3**, **H1K3** y **H1K5** que no presentan esta característica, resultaron los menos activos.

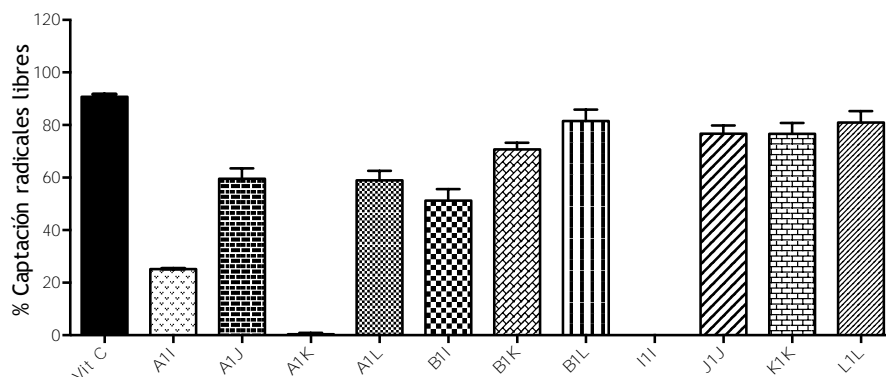


Gráfica 4. Porcentaje de neutralización del radical DPPH por los derivados de 3-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina (100 μ M) y la vitamina C utilizada como referencia (100 μ M). Cada valor de % de captación es la media \pm e.e.m. de 3 experimentos (n=3).

5.5.8. Capacidad de neutralización de radicales libres de los derivados de 4-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina

En general, como se observa en la **Gráfica 5**, los derivados de esta serie presentaron actividad como secuestradores de radicales libres, algunos de ellos (**B1K**, **B1L**, **J1J**, **K1K** y **L1L**) con porcentajes de captación similares a la vitamina C, usada como referencia, cuando fueron evaluados a concentración 100 μ M.

A1K y **I1I**, a pesar de presentar las dos características estructurales que se describieron en otros derivados con actividad, elevado número de grupos hidroxilo (4 ó 5), y estos ocupando posiciones contiguas sobre la cumarina o el sustituyente fenilo, carecen de actividad.



Gráfica 5. Porcentaje de neutralización del radical DPPH por los derivados de 3-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina ($100 \mu\text{M}$) y la vitamina C utilizada como referencia ($100 \mu\text{M}$). Cada valor de % de captación es la media \pm e.e.m. de 3 experimentos ($n=3$).

Tabla 46. CE_{50} de los derivados de 4-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina con mayor actividad secuestradora del radical DPPH \cdot y la vitamina C (fármaco de referencia). Cada valor de CE_{50} es la media \pm e.e.m. de 3 experimentos ($n=3$).

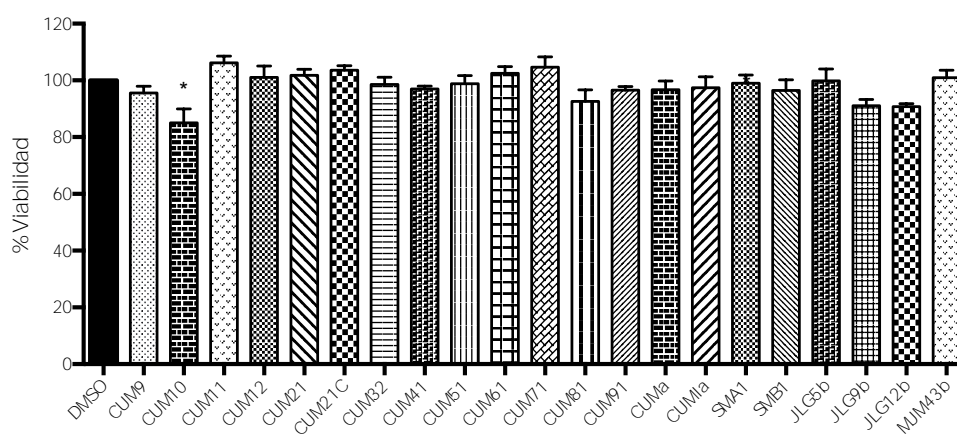
COMPUESTO	CE_{50} (μM)
A1J	$13,02 \pm 0,87$
A1L	$13,60 \pm 0,91$
B1K	$7,84 \pm 0,53$
B1L	$26,50 \pm 1,78$
J1J	$16,44 \pm 1,10$
K1K	$10,30 \pm 0,69$
L1L	$15,41 \pm 1,03$
Vitamina C	$5,02 \pm 0,34$

En la **Tabla 46** se observa que el derivado **B1K** en el que los sustituyentes hidroxilo ocupan las posiciones 6 y 7 sobre el núcleo de cumarina resultó el más potente de la serie. En general, la presencia de un residuo aminoacídico (**K1K** y **L1L**) condujo a un incremento de la actividad secuestradora de radicales libres.

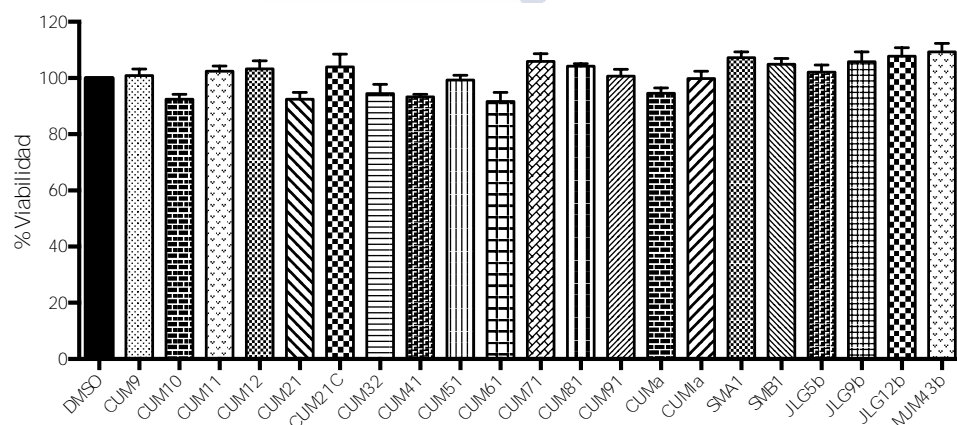
5.6. ACTIVIDAD NEUROTÓXICA Y NEUROPROTECTORA DE LOS DERIVADOS DE CUMARINA

5.6.1. Actividad neurotóxica y neuroprotectora de los derivados 3-fenilcumarina

Se evaluó inicialmente la posible actividad neurotóxica de estos derivados, a concentración 10 μ M, tanto sobre neuronas de corteza motora de rata (cultivo primario) como sobre las células de línea SH-SY5Y. El porcentaje de viabilidad celular tras 24h de tratamiento se representa en las **Gráficas 6 y 7**.



Gráfica 6. Evaluación del posible efecto neurotóxico de los derivados de 3-fenilcumarina sobre neuronas de corteza motora de rata. Las células se incubaron con las moléculas objeto de estudio a concentración 10 μ M disueltas en DMSO (1%). Los resultados se expresan como % de viabilidad frente al grupo control (DMSO) en, al menos, 5 experimentos \pm e.e.m. * $P < 0,05$.

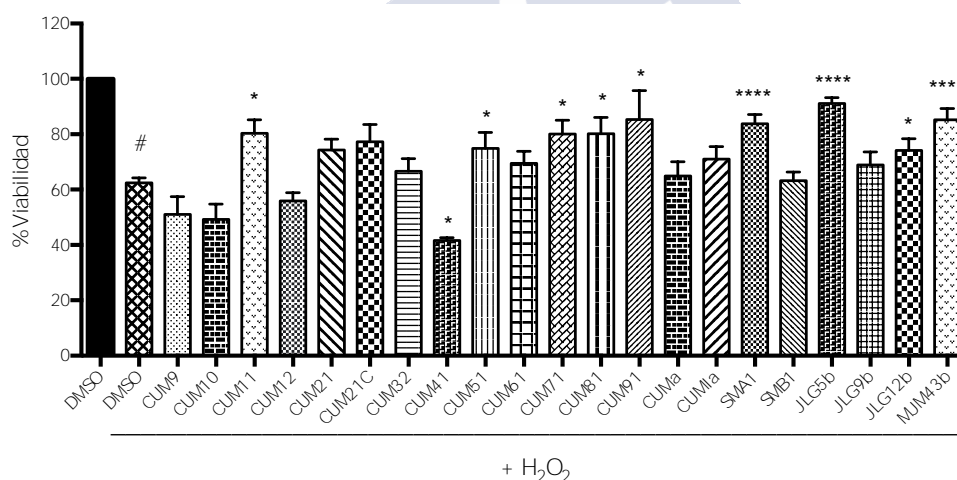


Gráfica 7. Evaluación del posible efecto neurotóxico de los derivados de 3-fenilcumarina sobre células SH-SY5Y (neuroblastoma humano). Las células se incubaron con las moléculas objeto de estudio a concentración 10 μ M disueltas en DMSO (1%). Los resultados se expresan como % de viabilidad frente al grupo control (DMSO) en, al menos, 5 experimentos \pm e.e.m.

Como se observa en la **Gráfica 6**, en general, los derivados 3-fenilcumarina no presentaron neurotoxicidad en cultivos primarios de neuronas de rata a la concentración evaluada a excepción del compuesto **CUM10**, que mostró un efecto neurotóxico estadísticamente significativo respecto al control.

En la **Gráfica 7** se observa que todos los derivados de 3-fenilcumarina estudiados, a una concentración 10 μM , carecen de toxicidad sobre las células SH-SY5Y. El compuesto **CUM10** que presentó toxicidad sobre las células de corteza motora de cultivo primario, carece de neurotoxicidad estadísticamente significativa en este modelo celular.

Una vez comprobado que, de forma general, los derivados de 3-fenilcumarina no presentan efecto neurotóxico, se evaluó su posible actividad neuroprotectora frente a un agente pro-oxidante (H_2O_2 , 100 μM).



Gráfica 8. Efectos neuroprotectores de los derivados de 3-fenilcumarina sobre neuronas de corteza motora de rata. Las células se incubaron con las moléculas objeto de estudio a concentración 10 μM disueltas en DMSO (1%) y con H_2O_2 (100 μM). Los resultados se expresan como % de viabilidad frente al grupo control (DMSO) en, al menos, 5 experimentos \pm e.e.m. El análisis estadístico se realizó en relación al grupo tratado con DMSO + H_2O_2 . * $P < 0,05$, **** $P < 0,0001$, # $P < 0,0001$ frente al grupo tratado solo con DMSO.

En general, los derivados con mayor efecto neuroprotector frente a H_2O_2 en las neuronas de cultivo primario obtenido a partir de corteza motora, fueron aquellos que presentaron dos o tres grupos hidroxilo en el fenilo de la posición 3 de la cumarina (**Gráfica 8**).

SMA1, **CUM11** y **CUM71** presentan tres grupos hidroxilos en *meta* y *para* del sustituyente fenilo en posición 3 del núcleo de cumarina (**CUM11** y **CUM71**). Para

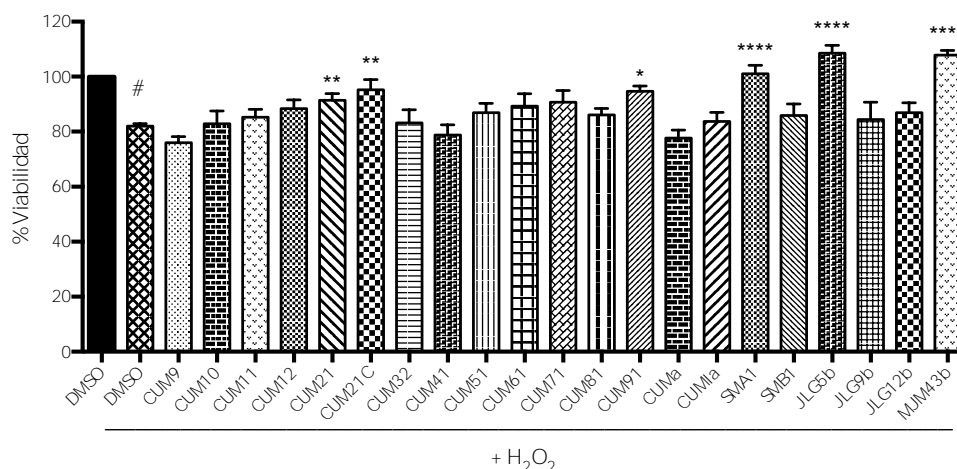
estos derivados, un grupo hidroxilo adicional en el núcleo cumarina permite mantener la actividad neuroprotectora; sin embargo aquellos derivados que combinan tres hidroxilos sobre el fenilo de la posición 3 con dos grupos hidroxilo en el núcleo de cumarina (**CUM61** y **SMB1**) carecen de actividad neuroprotectora.

Los derivados que presentan dos sustituyentes hidroxilo o metoxilo en posiciones *meta* y *para* del fenilo en posición 3 de la cumarina (**JLG5b**, **JLG12b** y **MJM43b**) mostraron actividad neuroprotectora independientemente de la posición que ocupen los dos sustituyentes hidroxilo sobre el núcleo de cumarina. Sin embargo, cuando ambos están en posición *meta* es necesario que uno de los grupos hidroxilo sobre la cumarina se localice en posición 6; **CUM21** y **CUM21C** resultaron inactivos mientras que **CUM51** y **CUM91** presentaron actividad neuroprotectora. 6-Hidroxi-(4'-hidroxifenil)cumarina (**CUM81**) fue el único derivado con un único hidroxilo sobre el sustituyente fenilo y el núcleo de cumarina que presentó actividad neuroprotectora.

El compuesto **CUM41**, parece potenciar la neurotoxicidad producida por H₂O₂ en las neuronas de cultivo primario.

En la **Gráfica 9** se muestran los resultados obtenidos al estudiar los posibles efectos neuroprotectores frente a H₂O₂ (100 µM) de los nuevos derivados de 3-fenilcumarinas, a una concentración 10 µM, en células SH-SY5Y. La neurotoxicidad inducida por el H₂O₂ en este modelo celular fue menor que la inducida en neuronas de cultivo primario.

Para algunos de los derivados que presentaron efecto neuroprotector sobre las neuronas de cultivo primario, no se observa este efecto sobre las células SH-SY5Y tratadas con H₂O₂ (100 µM). Mantuvieron su efecto neuroprotector **CUM91**, **SMA1**, **JLG5b** y **MJM43b**. Este efecto se observó además, en este modelo celular, para los derivados **CUM21** y **CUM21C**. A excepción de **SMA1**, todos los derivados con actividad presentan dos sustituyentes sobre el fenilo de la posición 3 en posiciones *meta/para* o *meta*, además de 1 ó 2 grupos hidroxilo en diferentes posiciones del núcleo de cumarina.



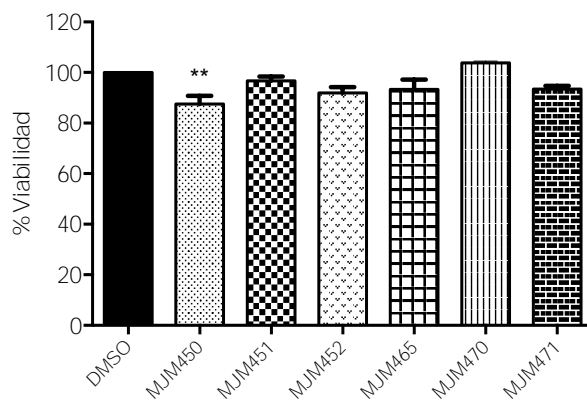
Gráfica 9. Efectos neuroprotectores de los derivados de 3-fenilcumarina sobre células SH-SY5Y. Las células se incubaron con las moléculas objeto de estudio a concentración 10 μ M disueltas en DMSO (1%) y con H₂O₂ (100 μ M). Los resultados se expresan como % de viabilidad frente al grupo control (DMSO) en, al menos, 5 experimentos \pm e.e.m. * P <0,05, ** P <0,005, **** P <0,0001, # P <0,0001 frente al grupo tratado solo con DMSO.

Si analizamos los derivados **JLG5b** y **MJM43b** y los comparamos con **JLG12b**, podemos observar que, para estructuras con dos sustituyentes iguales hidroxilo o metoxilo en las posiciones *meta/para* del fenilo, la presencia de dos grupos hidroxilos en las posiciones 7 y 8 del núcleo de cumarina, les confiere actividad neuroprotectora mientras que **JLG12b**, con esos dos hidroxilos en posiciones 5 y 7 del núcleo de cumarina carece de esta actividad en células SH-SY5Y.

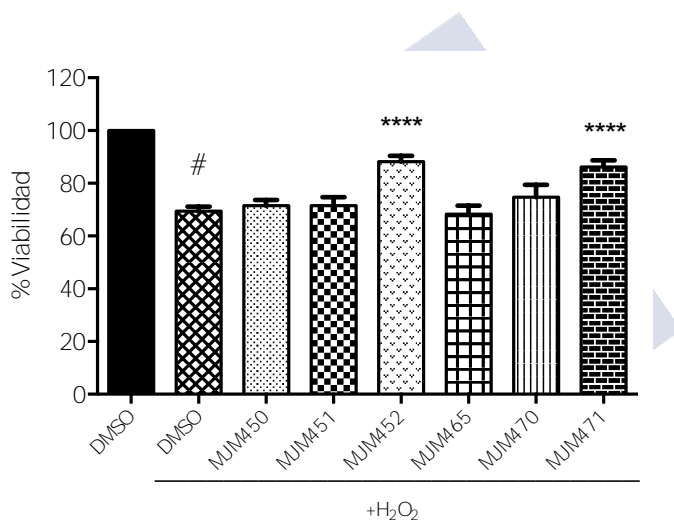
5.6.2. Actividad neurotóxica y neuroprotectora de los derivados de 3-(tiofen-2-il)cumarina

En la **Gráfica 10** se muestran los resultados obtenidos al estudiar el posible efecto neurotóxico de los derivados de 3-(tiofen-2-il)cumarina, a una concentración 10 μ M, en neuronas de corteza motora de rata (cultivo primario). Únicamente el derivado **MJM450**, disminuyó la viabilidad celular de forma estadísticamente significativa.

Se evaluó entonces, el posible efecto neuroprotector de estos derivados frente a H₂O₂ en el mismo modelo celular (**Gráfica 11**).



Gráfica 10. Evaluación del posible efecto neurotóxico de los derivados de 3-(tiofen-2-il)cumarina sobre neuronas de corteza motora de rata. Las células se incubaron con las moléculas objeto de estudio a concentración 10 μ M disueltas en DMSO (1%). Los resultados se expresan como % de viabilidad frente al grupo control (DMSO) en, al menos, 5 experimentos \pm e.e.m. ** $P < 0,005$.

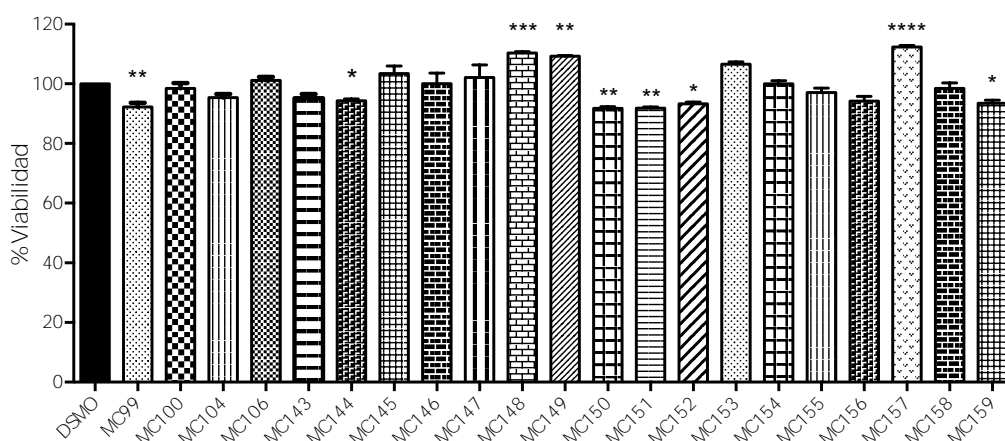


Gráfica 11. Efectos neuroprotectores de los derivados de 3-(tiofen-2-il)cumarina sobre neuronas de corteza motora de rata. Las células se incubaron con las moléculas objeto de estudio a concentración 10 μ M disueltas en DMSO (1%) y con H_2O_2 (100 μ M). Los resultados se expresan como % de viabilidad frente al grupo control (DMSO) en, al menos, 5 experimentos \pm e.e.m. **** $P < 0,0001$, # $P < 0,0001$ frente al grupo tratado solo con DMSO.

Los derivados **MJM452** y **MJM471**, ambos con dos grupos hidroxilo en las posiciones 7 y 8 del núcleo de la cumarina, presentan actividad neuroprotectora frente a H_2O_2 en neuronas de corteza motora de rata (cultivo primario). Esta misma sustitución resultó adecuada para la actividad neuroprotectora de los derivados de 3-fenilcumarina antes descritos. Los otros derivados de la serie de 3-(tiofen-2-il)cumarinas, que carecen de actividad presentan únicamente un grupo hidroxilo en posición 7 u 8 del núcleo de cumarina.

5.6.3. Actividad neurotóxica y neuroprotectora de los derivados de 3-(piridazin-3-il)cumarina

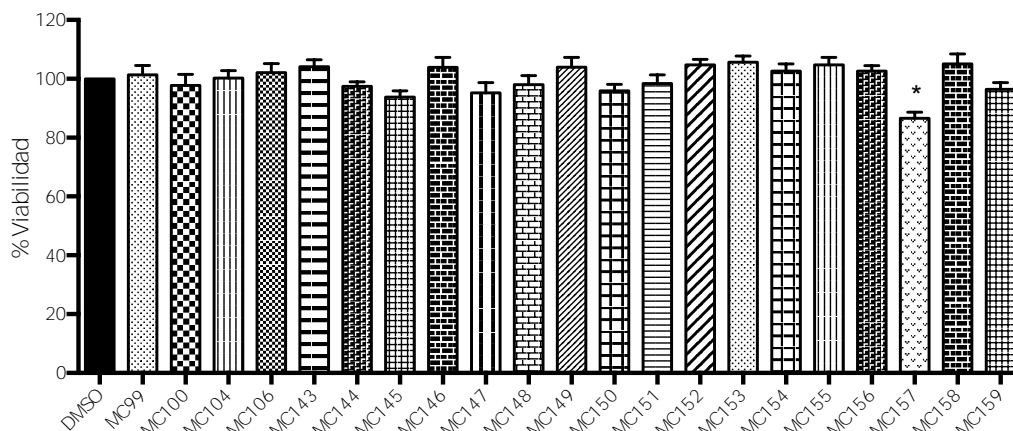
Se evaluó inicialmente la posible actividad neurotóxica de algunos de los derivados de esta serie, a concentración 10 μ M, tanto sobre neuronas de corteza motora de fetos de rata (cultivo primario) como sobre las células de línea SH-SY5Y. La selección de los derivados a evaluar se realizó teniendo en cuenta su actividad como IMAO-B (CI_{50} igual o inferior a 10 μ M).



Gráfica 12. Evaluación del posible efecto neurotóxico de los derivados seleccionados de 3-(piridazin-3-il)cumarina sobre neuronas de corteza motora de rata. Las células se incubaron con las moléculas objeto de estudio a concentración 10 μ M disueltas en DMSO (1%). Los resultados se expresan como % de viabilidad frente al grupo control (DMSO) en, al menos, 5 experimentos \pm e.e.m. * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$.

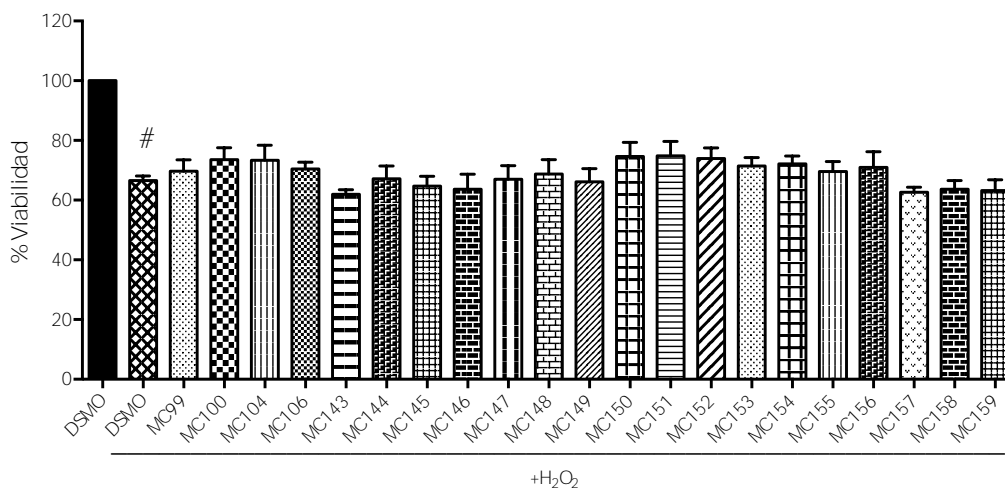
Los derivados **MC99**, **MC144**, **MC150**, **MC151**, **MC152** y **MC159** presentaron una toxicidad estadísticamente significativa para las neuronas de cultivo primario, como se observa en la **Gráfica 12**. Todos ellos presentan un átomo de halógeno (Cl o Br) en la posición 6 del anillo de piridazina y otro en posición 6, 7 ó 8 del núcleo de cumarina, excepto **MC99** que en la posición 6 del núcleo de cumarina presenta un grupo metilo. Sin embargo, otros derivados con estas mismas características estructurales no presentaron toxicidad.

La toxicidad de estos derivados desaparece sobre células de línea SH-SY5Y, como se puede observar en la **Gráfica 13**. Sobre este modelo celular, únicamente **MC157** mostró un efecto neurotóxico que resultó estadísticamente significativo.



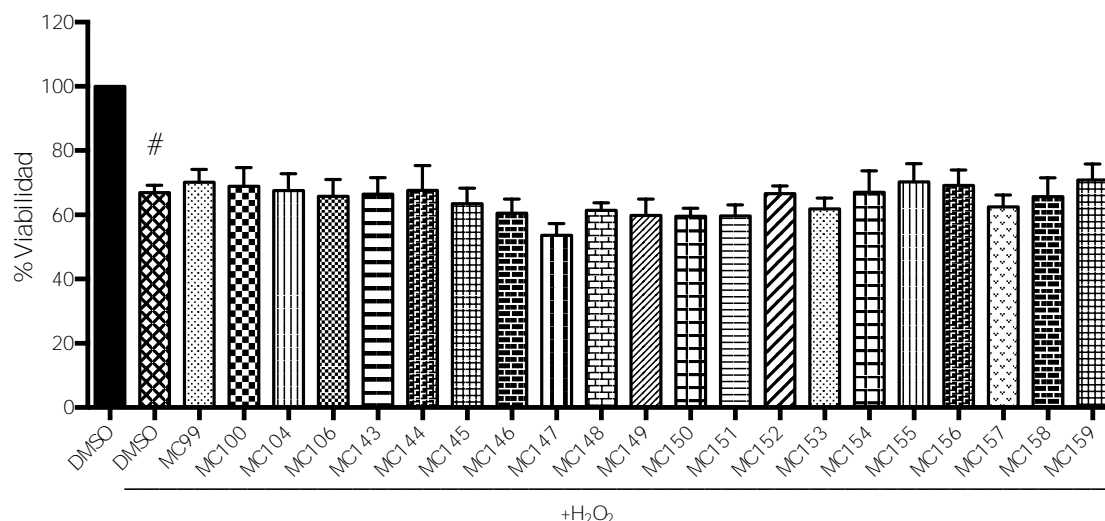
Gráfica 13. Evaluación del posible efecto neurotóxico de los derivados seleccionados de 3-(piridazin-3-il)cumarina sobre células SH-SY5Y. Las células se incubaron con las moléculas objeto de estudio a concentración 10 µM disueltas en DMSO (1%). Los resultados se expresan como % de viabilidad frente al grupo control (DMSO) en, al menos, 5 experimentos \pm e.e.m.

Una vez evaluada la neurotoxicidad de estos derivados, se evaluó su posible actividad neuroprotectora frente a H_2O_2 (100 µM) en los dos modelos celulares, el cultivo primario de neuronas de corteza motora y la línea celular SH-SY5Y.



Gráfica 14. Efectos neuroprotectores de los derivados seleccionados de 3-(piridazin-3-il)cumarina sobre neuronas de corteza motora de rata. Las células se incubaron con las moléculas objeto de estudio a concentración 10 µM disueltas en DMSO (1%) y con H_2O_2 (100 µM). Los resultados se expresan como % de viabilidad frente al grupo control (DMSO) en, al menos, 5 experimentos \pm e.e.m. # $P < 0,0001$ frente al grupo tratado solo con DMSO.

En la **Gráfica 14**, se observa que aunque algunos de los derivados parecen tener una tendencia a proteger las neuronas de cultivo primario de corteza motora frente a H_2O_2 (100 µM), ninguno de ellos mostró una actividad neuroprotectora que resultase estadísticamente significativa.



Gráfica 15. Efectos neuroprotectores de los derivados seleccionados de 3-(piridazin-3-il)cumarina sobre células SH-SY5Y. Las células se incubaron con las moléculas objeto de estudio a concentración 10 μ M disueltas en DMSO (1%) y con H_2O_2 (100 μ M). Los resultados se expresan como % de viabilidad frente al grupo control (DMSO) en, al menos, 5 experimentos \pm e.e.m. # $P < 0,0001$ frente al grupo tratado solo con DMSO.

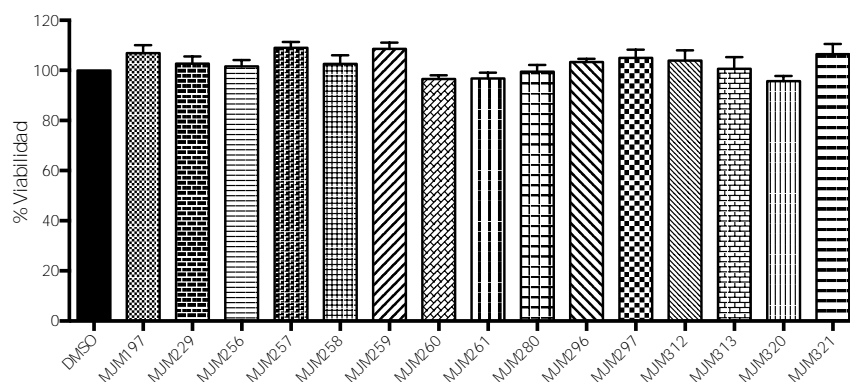
Los derivados de 3-(piridazin-3-il)cumarina evaluados carecen también de actividad neuroprotectora frente a H_2O_2 (100 μ M) en las células de línea SH-SY5Y, como se observa en la **Gráfica 15**.

A diferencia de otros análogos híbridos resveratrol-cumarina previamente estudiados, los derivados de 3-(piridazin-3-il)cumarina evaluados carecen de grupos hidroxilo en su estructura, lo que podría justificar la ausencia de actividad neuroprotectora de estas moléculas.

5.6.4. Actividad neurotóxica y neuroprotectora de los derivados de 3-ciclohexilamido-4-hidroxycumarina, 3-benzamido-4-hidroxycumarina y 3-heteroarilamidocumarina

En las distintas series de 3-amidocumarinas (**Tablas 6-8**) se seleccionaron aquellos derivados que presentan un grupo hidroxilo en posición 4, pero también los derivados de 3-heteroarilamida que carecen de este grupo hidroxilo.

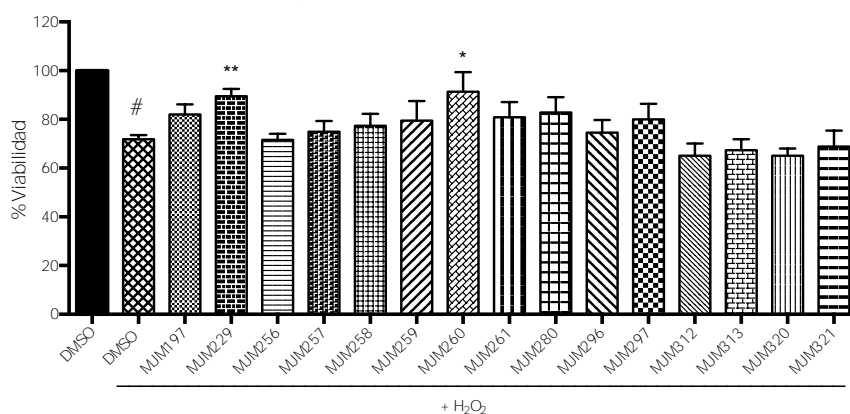
Se estudió su posible efecto neurotóxico, a concentración 10 μ M, sobre neuronas de cultivo primario de corteza motora de fetos de rata. En la **Gráfica 16** se observa que ninguno de estos derivados presenta actividad neurotóxica en este modelo celular a la concentración estudiada.



Gráfica 16. Evaluación del posible efecto neurotóxico de los derivados seleccionados de 3-amidocumarina sobre neuronas de corteza motora de rata. Las células se incubaron con las moléculas objeto de estudio a concentración 10 μ M disueltas en DMSO (1%). Los resultados se expresan como % de viabilidad frente al grupo control (DMSO) en, al menos, 5 experimentos \pm e.e.m.

Una vez comprobado que carecen de toxicidad, se evaluó también su actividad neuroprotectora frente a H_2O_2 (100 μ M).

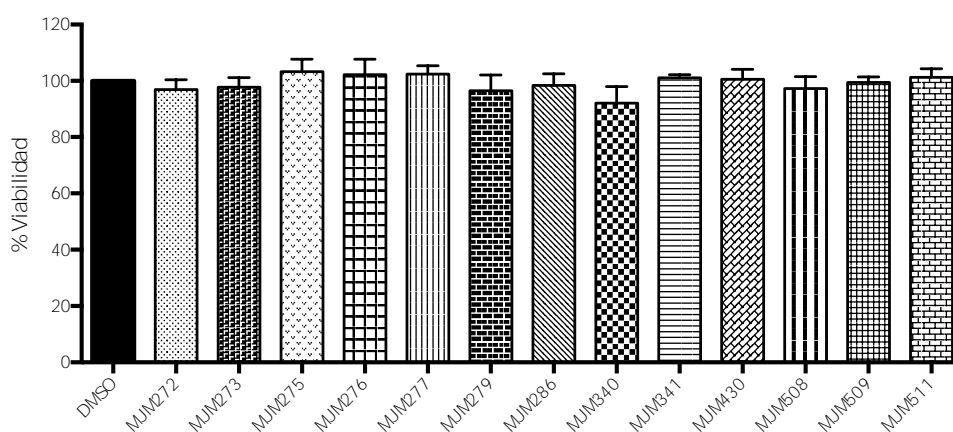
Como se observa en la **Gráfica 17**, los derivados 4-hidroxi-3-(3',4',5'-trimetoxibenzamido)cumarina (**MJM229**) y 3-(4'-clorobenzamido)-4-hidroxycumarina (**MJM260**) presentan una actividad neuroprotectora que fue estadísticamente significativa frente al grupo control. Aunque no es posible establecer una relación entre la estructura química y la actividad de los derivados de 3-benzamidocumarina, no parece que el grupo hidroxilo de la posición 4 sea determinante para la actividad puesto que la mayoría de los derivados, presentando esa sustitución, resultaron inactivos. Los derivados de 3-ciclohexilamidocumarina y 3-heteroarilamidocumarina resultaron también inactivos presentando o no el grupo hidroxilo en la posición 4.



Gráfica 17. Efectos neuroprotectores de los derivados seleccionados de 3-amidocumarina sobre neuronas de corteza motora de rata. Las células se incubaron con las moléculas objeto de estudio a concentración 10 μ M disueltas en DMSO (1%) y con H_2O_2 (100 μ M). Los resultados se expresan como % de viabilidad frente al grupo control (DMSO) en, al menos, 5 experimentos \pm e.e.m. * P <0,05, ** P <0,005, # P <0,0001 frente al grupo tratado solo con DMSO.

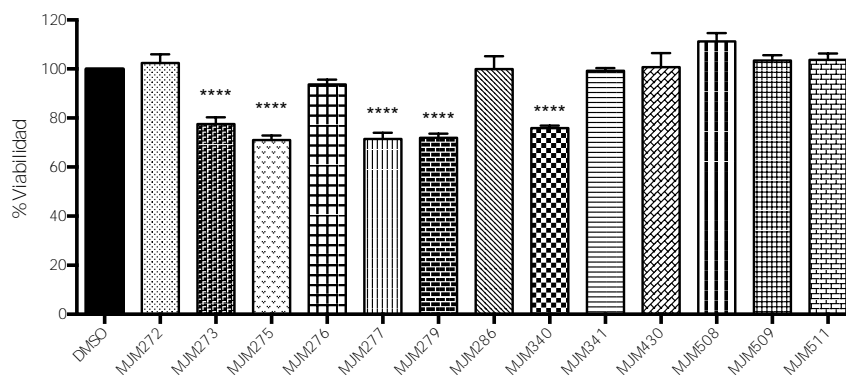
5.6.5. Actividad neurotóxica y neuroprotectora de los derivados de 7-benzamido-4-metilcumarina, 7-alkilamido-4-metilcumarina y 7-heteroarilamido-4-metilcumarina

Se evaluó la posible actividad neurotóxica de estos derivados, a concentración 10 μM , tanto sobre neuronas de corteza motora de rata (cultivo primario) como sobre las células de línea SH-SY5Y. El porcentaje de viabilidad celular tras 24h de tratamiento se representa en las **Gráficas 18 y 19**.

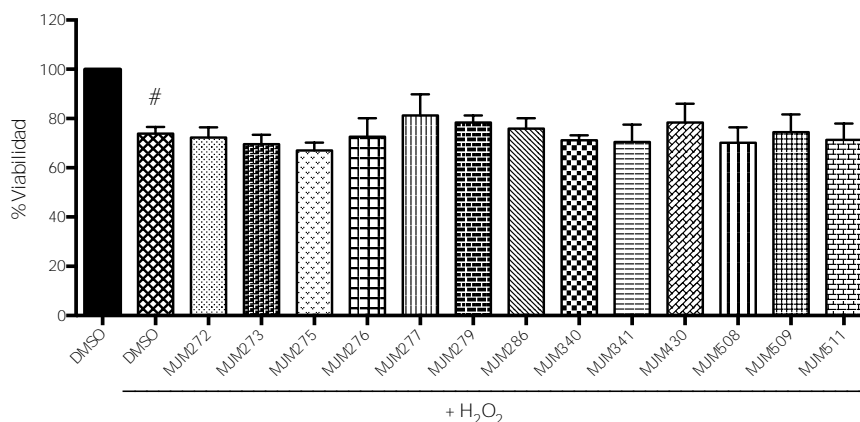


Gráfica 18. Evaluación del posible efecto neurotóxico de los derivados de 7-amidocumarina sobre neuronas de corteza motora de rata. Las células se incubaron con las moléculas objeto de estudio a concentración 10 μM disueltas en DMSO (1%). Los resultados se expresan como % de viabilidad frente al grupo control (DMSO) en, al menos, 5 experimentos \pm e.e.m.

Ninguno de los derivados de 7-amidocumarina mostró toxicidad en las neuronas de cultivo primario de corteza motora a la concentración estudiada (10 μM) como se puede observar en la **Gráfica 18**. Sin embargo, en la **Gráfica 19** se muestra que los derivados **MJM273**, **MJM275**, **MJM277**, **MJM279** que presentan un único sustituyente en posición *para* del anillo bencénico del sustituyente benzamida en posición 7 y la 7-(tiofen-2-ilamido)cumarina (**MJM340**) presentan una toxicidad que resultó estadísticamente significativa frente al control (células tratadas con DMSO) en células SH-SY5Y. Por tanto, contrariamente a lo esperado, los derivados de 7-amidocumarina estudiados presentaron menos problemas de toxicidad sobre neuronas de cultivo primario de corteza motora que sobre células de línea SH-SY5Y.

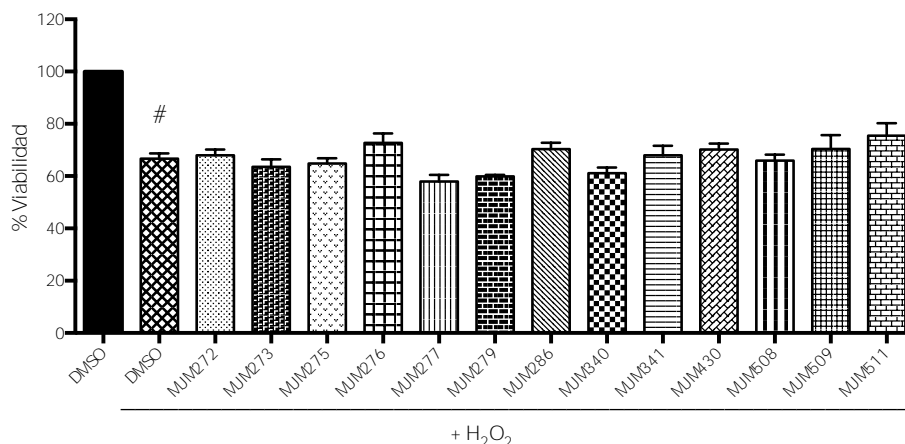


Gráfica 19. Evaluación del posible efecto neurotóxico de los derivados de 7-amidocumarina sobre células SH-SY5Y. Las células se incubaron con las moléculas objeto de estudio a concentración 10 µM disueltas en DMSO (1%). Los resultados se expresan como % de viabilidad frente al grupo control (DMSO) en, al menos, 5 experimentos ± e.e.m. * $P < 0,05$.



Gráfica 20. Efectos neuroprotectores de los derivados de 7-amidocumarina sobre neuronas de corteza motora de rata. Las células se incubaron con las moléculas objeto de estudio a concentración 10 µM disueltas en DMSO (1%) y con H₂O₂ (100 µM). Los resultados se expresan como % de viabilidad frente al grupo control (DMSO) en, al menos, 5 experimentos ± e.e.m. # $P < 0,0001$ frente al grupo tratado solo con DMSO.

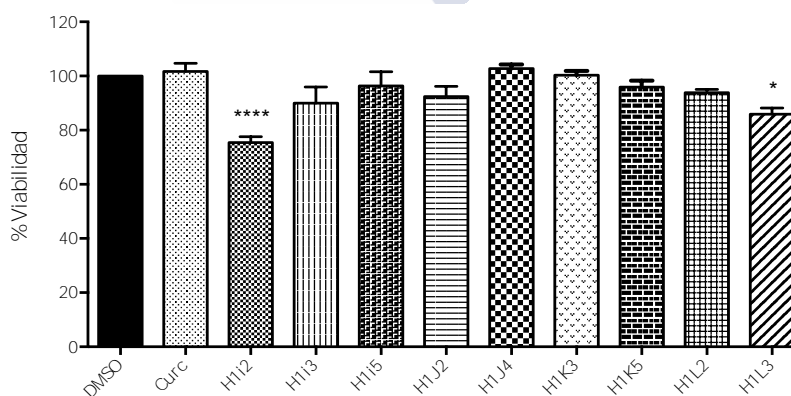
Adicionalmente se estudió el posible efecto neuroprotector de estos derivados frente a H₂O₂ (100 µM) en los mismos modelos celulares en los que se estudió su neurotoxicidad. Como se puede observar en las **Gráficas 20 y 21**, estos derivados, a la concentración estudiada, 10 µM, carecen de actividad neuroprotectora tanto sobre las neuronas de cultivo primario de corteza motora como sobre las células de línea SH-SY5Y. Al igual que los derivados de 3-(piridazin-3-il)cumarina, estos derivados de 7-amidocumarina carecen de grupos hidroxilo en su estructura, lo que podría explicar la ausencia de actividad neuroprotectora.



Gráfica 21. Efectos neuroprotectores de los derivados de 7-amidocumarina sobre células SH-SY5Y (neuroblastoma humano). Las células se incubaron con las moléculas objeto de estudio a concentración 10 μ M disueltas en DMSO (1%) y con H_2O_2 (100 μ M). Los resultados se expresan como % de viabilidad frente al grupo control (DMSO) en, al menos, 5 experimentos \pm e.e.m. # $P < 0,0001$ frente al grupo tratado solo con DMSO.

5.6.6. Actividad neurotóxica y neuroprotectora de 3,3'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina (H1i2) y de los derivados de 3-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina

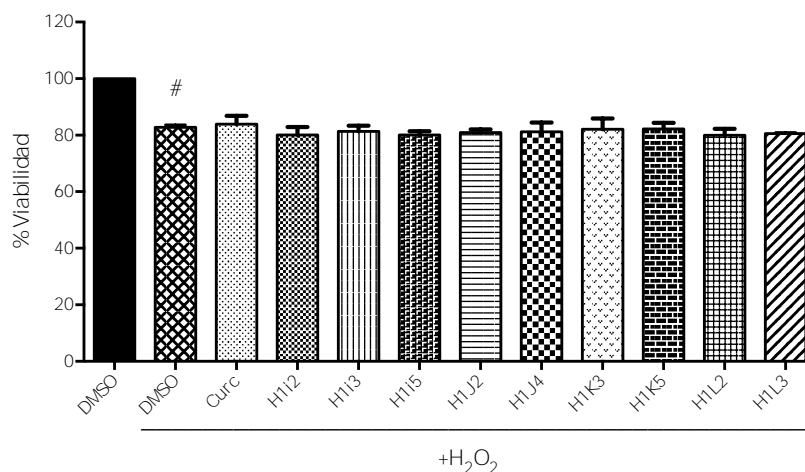
Se evaluó la actividad neurotóxica de estos derivados, a concentración 10 μ M, en células de línea SH-SY5Y. En la **Gráfica 22** se puede observar que **H1i2** y **H1L3** disminuyeron la viabilidad de forma estadísticamente significativa frente al grupo control.



Gráfica 22. Evaluación del posible efecto neurotóxico de los análogos híbridos curcumina-curcumina sobre células SH-SY5Y. Las células se incubaron con las moléculas objeto de estudio a concentración 10 μ M disueltas en DMSO (1%) y con H_2O_2 (100 μ M). Los resultados se expresan como % de viabilidad frente al grupo control (DMSO) en, al menos, 5 experimentos \pm e.e.m. * $P < 0,05$, **** $P < 0,0001$.

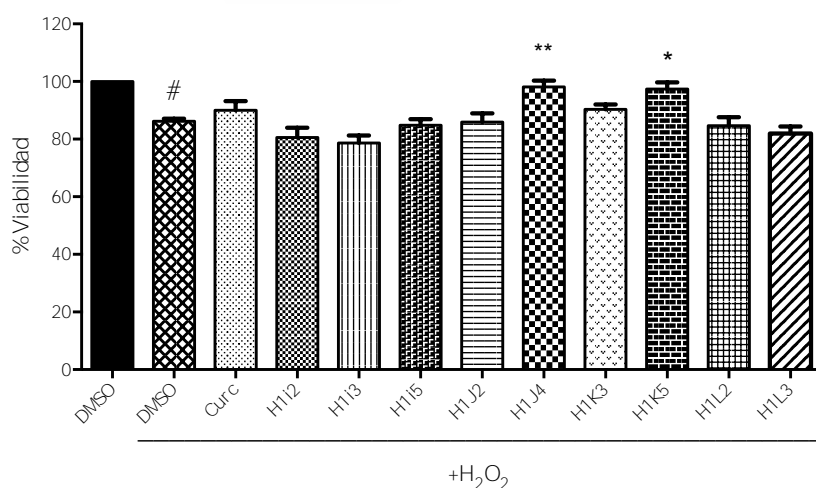
Se estudió también su posible efecto neuroprotector frente a H_2O_2 (100 μ M), tanto en neuronas de cultivo primario de corteza motora como en células de línea SH-SY5Y.

Como se puede observar en la **Gráfica 23**, ninguna de las moléculas estudiadas presentó un efecto neuroprotector que resultase estadísticamente significativo frente al control en las neuronas de cultivo primario de corteza motora. Este efecto tampoco se observó para la curcumina.



Gráfica 23. Efectos neuroprotectores de los análogos híbridos curcumina-cumarina sobre neuronas de corteza motora de rata. Las células se incubaron con las moléculas objeto de estudio a concentración 10 μ M disueltas en DMSO (1%) y con H₂O₂ (100 μ M). Los resultados se expresan como % de viabilidad frente al grupo control (DMSO) en, al menos, 5 experimentos \pm e.e.m. [#]P<0,0001 frente al grupo tratado solo con DMSO.

Sin embargo, en la **Gráfica 24** se observa que **H1J4** y **H1K5** ejercieron un efecto neuroprotector que fue estadísticamente significativo frente al grupo control en las células de línea SH-SY5Y. Los resultados obtenidos no permiten establecer una relación entre la estructura química y la actividad neuroprotectora de estos derivados.

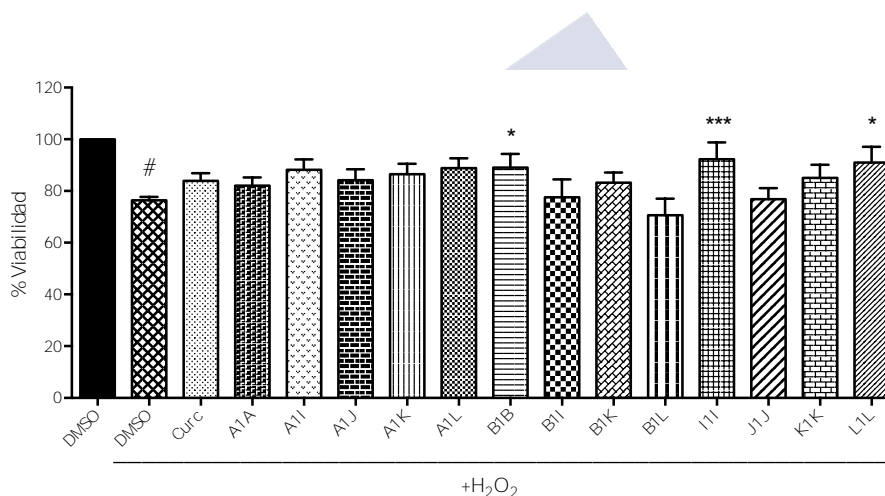


Gráfica 24. Efectos neuroprotectores de los derivados de cumarina-curcumina sobre células SH-SY5Y. Las células se incubaron con las moléculas objeto de estudio a concentración 10 μ M disueltas en DMSO (1%) y con H₂O₂ 100 μ M. Los resultados se expresan como % de viabilidad frente al grupo control (DMSO + H₂O₂) en, al menos, 5 experimentos \pm e.e.m. *P<0,05, **P<0,005, [#]P<0,0001 frente al grupo tratado solo con DMSO.

5.6.7. Actividad neurotóxica y neuroprotectora de los derivados de 4,4'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina y 4-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina

Estos derivados reaccionan con alguno de los componentes del medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las células de línea SH-SY5Y, por lo que no se pudieron estudiar sus efectos en este modelo celular.

En la **Gráfica 25** se observa que los derivados **B1B**, **I1I** y **L1L**, a concentración 10 μ M, exhibieron actividad neuroprotectora en neuronas de cultivo primario de corteza motora tratadas con H_2O_2 (100 μ M) de forma estadísticamente significativa frente al grupo control.

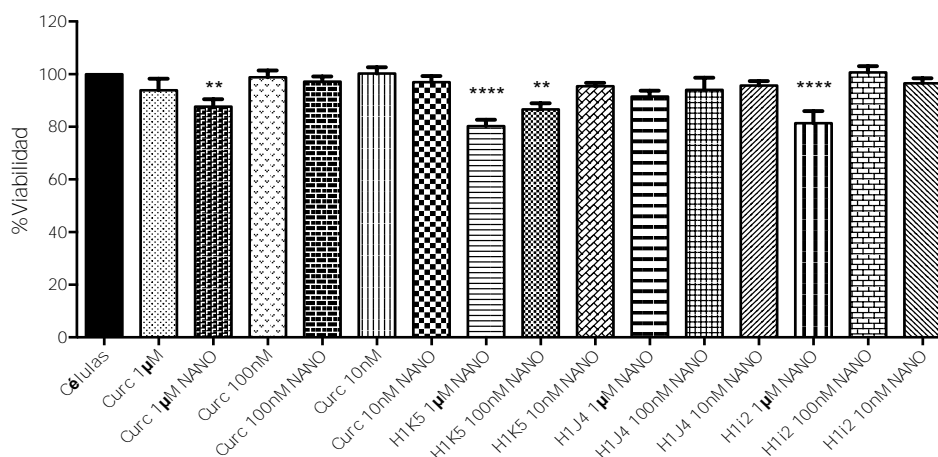


Gráfica 25. Efectos neuroprotectores de los análogos híbridos curcumina-cumarina sobre neuronas de corteza motora de rata. Las células se incubaron con las moléculas objeto de estudio a concentración 10 μ M disueltas en DMSO (1%) y con H_2O_2 (100 μ M). Los resultados se expresan como % de viabilidad frente al grupo control (DMSO) en, al menos, 5 experimentos \pm e.e.m. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, # $P < 0,0001$ frente al grupo tratado solo con DMSO.

5.6.8. Actividad neurotóxica y neuroprotectora de nanopartículas biodegradables de los derivados de 3-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina

En los cultivos celulares se observó que algunos de estos análogos híbridos curcumina-cumarina presentaban problemas de solubilidad en el medio de cultivo. Por ello, los derivados **H1J4**, **H1K5** y **H1i2** se formularon en nanopartículas biodegradables para una nueva evaluación de su efecto neurotóxico y neuroprotector que se realizó en células de línea SH-SY5Y.

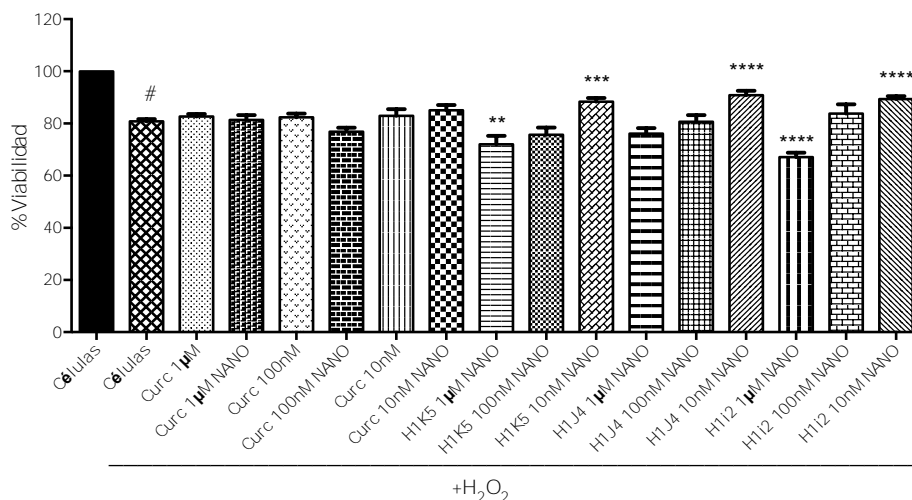
En la **Gráfica 26** se muestra que, excepto para **H1J4**, las nanopartículas biodegradables de los diferentes derivados a concentración 1 μ M, resultaron tóxicos para las células, observándose una viabilidad celular inferior al grupo control que fue estadísticamente significativa. Sin embargo, a medida que la concentración de los análogos híbridos cumarina-curcumina disminuye, la toxicidad desciende.



Gráfica 26. Evaluación del posible efecto neurotóxico sobre células SH-SY5Y de los análogos híbridos curcumina-cumarina formulados como nanopartículas biodegradables. Las células se incubaron con las moléculas objeto de estudio a distintas concentraciones. Los resultados se expresan como % de viabilidad frente al grupo control (Células) en, al menos, 5 experimentos \pm e.e.m. ** $P < 0,005$, **** $P < 0,0001$.

En los estudios de la actividad neuroprotectora frente a H_2O_2 (100 μ M), se observó que formulados en nanopartículas, los derivados **H1K5**, **H1J4** y **H1I2**, a baja concentración (10 nM), presentaban una actividad neuroprotectora estadísticamente significativa.

Por tanto, al mejorar la penetración en las células, estos derivados pasan de presentar un efecto neurotóxico, cuando se tratan los cultivos con una concentración 10 μ M de los mismos, a tener un efecto neuroprotector a concentración 10 nM (**Gráfica 27**).



Gráfica 27. Efectos neuroprotectores sobre células SH-SY5Y de los análogos curcumina-cumarina formulados como nanopartículas biodegradables. Las células se incubaron con las moléculas objeto de estudio a diferentes concentraciones y con H₂O₂ 100 µM. Los resultados se expresan como % de viabilidad frente al grupo control (Células + H₂O₂) en, al menos, 5 experimentos ± e.e.m. **P<0,005, ***P<0,001, ****P<0,0001, #P<0,0001 frente al grupo tratado solo con Células.

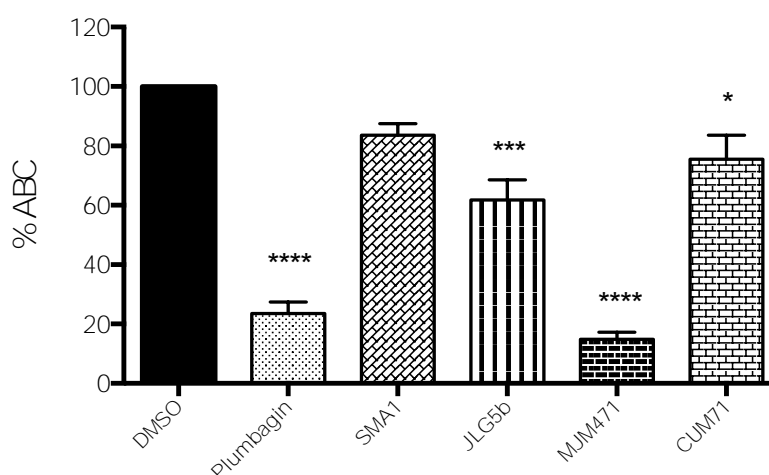


5.7. REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO)

Se seleccionaron para su estudio los derivados de 3-fenilcumarina **SMA1** y **JLG5b** con actividad neuroprotectora frente a H_2O_2 tanto en neuronas de cultivo primario de corteza motora como en células de línea SH-SY5Y y **CUM71** y el derivado de 3-(tiofen-2-il)cumarina **MJM471** ambos con actividad neuroprotectora frente a H_2O_2 en células SH-SY5Y.

Se evaluó la generación intracelular de ERO por las células de línea SH-SY5Y como consecuencia del tratamiento con H_2O_2 (100 μ M) utilizando la sonda fluorescente DFCDA, que incrementa su fluorescencia cuando se generan radicales libres dentro de la célula.

En la **Gráfica 28**, se observa una reducción significativa de las ERO cuando las células se pre-trataron durante 24 h con **CUM71**, **JLG5b** y sobre todo con **MJM471** que mostró un descenso en la producción de ERO similar al producido por plumbagin utilizado como fármaco de referencia. Por tanto, estos resultados sugieren que la protección celular ejercida por estos derivados de cumarina, frente a la toxicidad producida por H_2O_2 , está relacionada con un descenso de la producción de radicales de oxígeno.



Gráfica 28. Efecto del pre-tratamiento de los derivados de cumarina seleccionados y plumbagin (control negativo) a concentración 10 μ M sobre la producción de ERO por células SH-SY5Y en presencia de H_2O_2 (100 μ M). ABC: área bajo la curva. Los resultados son expresados como la media de 3 experimentos \pm e.e.m. y fueron normalizados como % del control. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$.

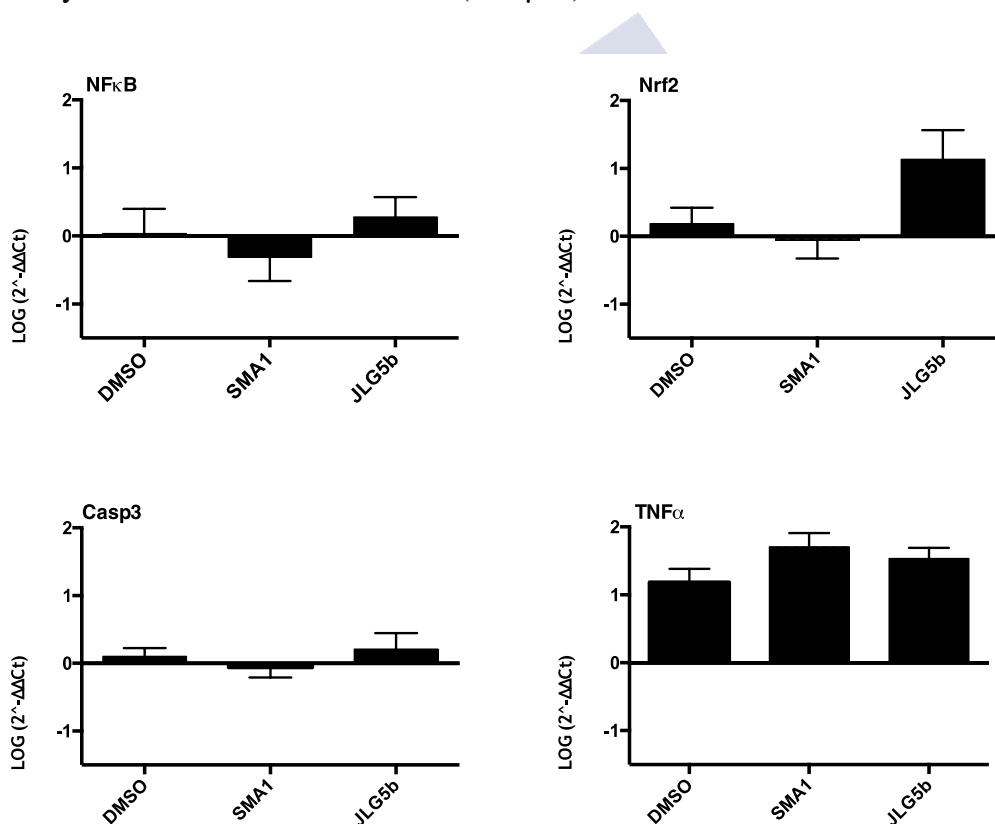
CUM71, **JLG5b**, **MJM471** presentan uno o dos grupos hidroxilo sobre el núcleo de cumarina mientras que **SMA1** presenta tres grupos hidroxilo sobre el sustituyente fenilo en la posición 3 de la cumarina. Además, en los dos derivados de cumarina con mayor actividad, **JLG5b** y **MJM471**, los dos grupos hidroxilo están en posiciones contiguas (7 y 8) del núcleo de cumarina.



5.8. EXPRESIÓN DE NF- κ B, NRF2, CASP3 Y TNF- α

Se seleccionaron los derivados de 3-fenilcumarina **SMA1** y **JLG5b**, ambos con efecto neuroprotector frente a H_2O_2 tanto en neuronas de cultivo primario de corteza motora como en células de línea SH-SY5Y, para evaluar las posibles modificaciones que pudieran producir en la expresión de NF- κ B, Nrf2, Casp3 y TNF- α , mediante la técnica de RT-qPCR.

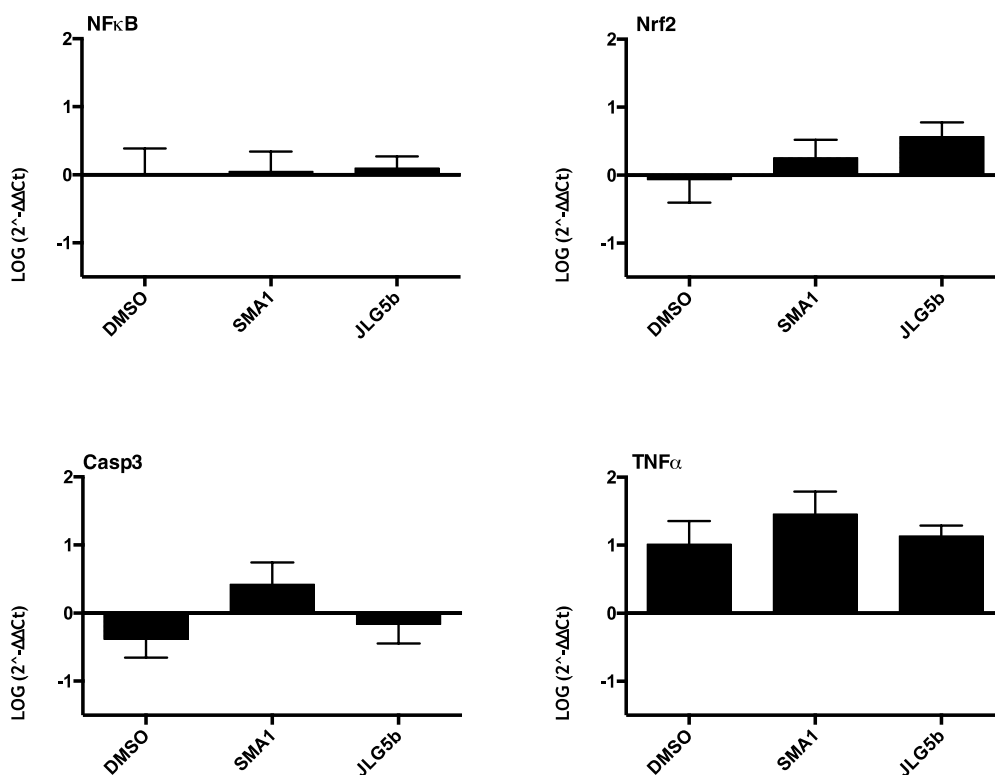
Las posibles modificaciones en la expresión de NF- κ B, Nrf2, Casp3 y TNF- α producidas por el tratamiento durante 24 h con los derivados de cumarina **SMA1** y **JLG5b** se estudiaron en células SH-SY5Y que no recibieron ningún tratamiento adicional y en células tratadas con H_2O_2 (100 μ M).



Gráfica 29. Niveles relativos de ARNm codificante de NF κ B, Nrf2, Casp3 y TNF α en células SH-SY5Y tratadas con los derivados **SMA1** y **JLG5b** (10 μ M) o el vehículo (DMSO 1%). Los valores de expresión fueron corregidos por los valores de expresión de β -actina. Cada barra representa la media de \pm eem de 3 experimentos (n=3).

En la **Gráfica 29** se observa que los niveles relativos de ARNm codificante de NF- κ B, Nrf2, Casp3 y TNF- α no muestran cambios significativos en las células tras el tratamiento con **SMA1** y **JLG5b**, respecto a las células tratadas con el vehículo (DMSO 1%).

SMA1 presentó una ligera tendencia a disminuir la expresión de Nf- κ B, Nrf2 y Casp3, mientras **JLG5b** mostró una tendencia a incrementar la expresión de Nrf2, un gen que protege frente a la apoptosis inducida por H₂O₂, aumentando la expresión de diferentes enzimas antioxidantes como SOD1, CAT, GPX, HO-1, GSTP-1, para mantener la homeostasia redox.



Gráfica 30. Niveles relativos de ARNm codificante de NF- κ B, Nrf2, Casp3 y TNF- α en células SH-SY5Y tratadas con SMA y JLG5b (10 μ M), o el vehículo (DMSO) y H₂O₂ (100 μ M). Los valores de expresión fueron corregidos por los valores de expresión de β -actina. Cada barra representa la media de \pm eem de 3 experimentos.

En la **Gráfica 30** se observa que igual que ocurrió en las células no tratadas con H₂O₂, el tratamiento con **SMA1** y **JLG5b** no produjo cambios significativos en la expresión de NF- κ B, Nrf2, Casp3 y TNF- α frente al control, células tratadas con el vehículo (DMSO 1%).

Se observó una ligera tendencia a un incremento de la expresión de Casp3 en las células tratadas con **SMA1** en presencia de H₂O₂ y una tendencia a disminuir la expresión de Nrf2 en las células tratadas con **JL5b**, reduciéndose las diferencias que existían respecto al control en ausencia de H₂O₂.

5.9. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS DERIVADOS DE CUMARINA Y PREDICCIÓN TEÓRICA DE PASO A TRAVÉS DE BHE

Como se comentó previamente en el apartado de “Material y Métodos”, para el cálculo de las propiedades físico-químicas de los derivados de cumarina se utilizó el programa informático MolInspiration. Se calcularon el coeficiente de reparto octanol/agua (LogP), el área de superficie polar de la molécula (TPSA), el número de átomos y peso molecular (PM) de cada estructura, el número de enlaces ON y OHNH, así como el volumen (VM) y el número de enlaces rotantes (rotb); todas estas son propiedades que condicionan el paso de los compuestos a través de membranas biológicas. El paso a través de BHE se predijo teóricamente utilizando el programa “CBligand-BBB predictor”. Las **Tablas 47-56** muestran la existencia o ausencia de violaciones en la regla de Lipinski que da una idea de su biodisponibilidad y la predicción teórica de paso a través de BHE.

5.9.1. Propiedades fisicoquímicas y predicción de paso a través de BHE para los derivados de 3-fenilcumarina

En la **Tabla 47** se puede observar que los derivados de 3-fenilcumarina presentan, en general, una liposolubilidad (LogP) similar o incluso superior a los fármacos de referencia, siendo **CUM9, CUM10, CUM12, CUM21, CUMa y CUMIa** los más liposolubles con valores de reparto octanol/agua (LogP) superiores a 3,00; en todos los casos, este valor es inferior a 5 por lo que tampoco deberían de presentar problemas para disolverse en el medio acuoso del organismo. Por el contrario **CUM11, CUM51, CUM61, CUM71, SMB1 y JLG12b**, son los que muestran una menor liposolubilidad con valores de LogP inferiores a 2,0 pero similares a los que presenta la eserina, usada como fármaco de referencia. El mayor valor de TPSA encontrado para estos derivados de cumarina, está vinculado a la presencia de un mayor número de grupos hidroxilo en la molécula.

Otras propiedades como el número de átomos, el peso molecular, el número de enlaces ON y OHNH, el volumen (MV) y el número de enlaces rotantes son comparables a las presentadas por los fármacos de referencia, especialmente la eserina, para los que se ha demostrado que atraviesan membranas celulares y acceden al SNC.

Ninguno de ellos presenta violaciones de la regla de Lipinski, por tanto, al menos teóricamente, todos ellos tienen propiedades adecuadas para atravesar las membranas biológicas. Sin embargo, la predicción teórica de paso a través de BHE indica que solo **CUMa** y **CUMIa** tienen las propiedades adecuadas para cruzarla.

Tabla 47. Propiedades moleculares de los derivados de 3-fenilcumarina calculadas utilizando el programa informático MolInspiration y predicción teórica de su paso a través de BHE utilizando el programa informático CBLigand-BBB

COMP.	LogP	TPSA	n° átom	PM	n° ON	n° OHNH	n° rotb	VM	n° violacion	BHE (±)
CUM9	3,83	48,68	21	282,30	4	0	3	251,09	0	-
CUM10	3,29	59,67	20	268,27	4	1	2	233,56	0	-
CUM11	1,97	111,12	21	286,24	6	4	1	232,07	0	-
CUM12	3,29	59,67	20	268,27	4	1	2	233,56	0	-
CUM21	3,28	68,91	22	298,29	5	1	3	259,11	0	-
CUM21C	2,20	90,90	20	270,24	5	3	1	224,05	0	-
CUM32	2,46	90,90	20	270,24	5	3	1	224,05	0	-
CUM41	2,76	70,67	19	254,24	4	2	1	216,03	0	-
CUM51	1,91	111,12	21	286,24	6	4	1	232,07	0	-
CUM61	1,68	131,35	22	302,24	7	5	1	240,08	0	-
CUM71	1,97	111,12	21	286,24	6	4	1	232,07	0	-
CUM81	2,76	70,67	19	254,24	4	2	1	216,03	0	-
CUM91	2,20	90,90	20	270,24	5	3	1	224,05	0	-
CUMa	3,26	50,44	18	238,24	3	1	1	208,01	0	+
CUMIa	3,23	50,44	18	238,24	3	1	1	208,01	0	+
SMA1	2,48	90,90	20	270,24	5	3	1	224,05	0	-
SMB1	1,49	131,35	22	302,24	7	5	1	240,08	0	-
JLG5b	2,01	111,12	21	286,24	6	4	1	232,07	0	-
JLG9b	2,94	70,67	19	254,24	4	2	1	216,03	0	-
JLG12b	1,97	111,12	21	286,24	6	4	1	232,07	0	-
MJM43b	2,62	89,14	23	314,29	6	2	3	267,12	0	-
Deprenilo	2,26	3,24	13	173,26	1	0	3	185,84	0	+
Tacrina	3,05	38,92	15	198,27	2	2	0	191,53	0	+
Eserina	1,94	44,81	20	275,35	5	1	2	261,48	0	+

5.9.2. Propiedades fisicoquímicas y predicción de paso a través de BHE para los derivados de 3-(tiofen-2-il)cumarina

Como se ha comentado para los derivados de 3-fenilcumarina, los derivados de 3-(tiofen-2-il)cumarina, teóricamente, poseen propiedades físico-químicas adecuadas (Tabla 48) para una buena disponibilidad. **MJM465** presenta el mayor valor de LogP, combinado con una baja TPSA, comparable a la mostrada por la eserina.

A pesar de que todos ellos presentan unas propiedades físico-químicas que teóricamente son adecuadas para el paso a través de membranas, la predicción teórica indica que **MJM452** y **MJM471**, ambos con dos sustituyentes hidroxilo sobre el núcleo de cumarina, que presentan un valor de TPSA superior a 70, no son capaces de atravesar la BHE.

Tabla 48. Propiedades moleculares de los derivados de 3-(tiofen-2-il)cumarina calculadas utilizando el programa informático MolInspiration y predicción teórica de su paso a través de BHE utilizando el programa informático CBLigand-BBB

COMP.	LogP	TPSA	n° átom	PM	n° ON	n° OHNH	n° rotb	VM	n° violacion	BHE (±)
MJM450	3,06	50,44	17	244,27	3	1	1	198,73	0	+
MJM451	2,82	50,44	17	244,27	3	1	1	198,73	0	+
MJM452	2,56	70,67	18	260,27	4	2	1	206,74	0	-
MJM465	3,99	50,44	18	323,17	3	1	1	216,61	0	+
MJM470	3,76	50,44	18	323,17	3	1	1	216,61	0	+
MJM471	3,49	70,67	19	339,17	4	2	1	224,63	0	-
Deprenilo	2,26	3,24	13	173,26	1	0	3	185,84	0	+
Tacrina	3,05	38,92	15	198,27	2	2	0	191,53	0	+
Eserina	1,94	44,81	20	275,35	5	1	2	261,48	0	+

5.9.3. Propiedades fisicoquímicas y predicción de paso a través de BHE para los derivados de 3-(6-oxo-1,6-dihidropiridazin-3-il)cumarina

Los compuestos **MC74**, **MC80** y **MC81**, con un sustituyente bencilo sobre uno de los átomos de nitrógeno del anillo de piridazina y un metilo sobre el núcleo de cumarina, son los más liposolubles de esta serie. Todos ellos presentan valores de LogP superiores a 3,50 (**Tabla 49**). En general, presentan un mayor número de átomos, mayor peso molecular y mayor volumen que a los presentados por los fármacos de referencia. A pesar de ello, no presentan violaciones de la regla de Lipinski, por tanto, al menos teóricamente, todos ellos tienen propiedades adecuadas para atravesar las membranas biológicas. Asimismo, según la predicción teórica, todos ellos pueden atravesar la BHE; sin embargo para **MC76**, **MC77** y **MC79** también con altos valores de LogP pero en los que el sustituyente metilo es intercambiado por metoxilo, la predicción resultó negativa.

El reemplazo del sustituyente bencilo por hidrógeno o metilo, y la presencia de un sustituyente metoxilo en vez del metilo sobre el núcleo de cumarina, originó los compuestos menos liposolubles, **MC85**, **MC86**, **MC88**, **MC91**, **MC95** y **MC97**, con

valores de LogP inferiores a 2,0. La predicción teórica para el paso a través de BHE resultó negativa para estos derivados de cumarina.

Tabla 49. Propiedades moleculares de los derivados de 3-(6-oxo-1,6-dihidropiridazin-3-il)cumarina calculadas utilizando el programa informático MolInspiration y predicción teórica de su paso a través de BHE utilizando el programa informático CBLigand-BBB

COMP.	LogP	TPSA	n° átom	PM	n° ON	n° OHNH	n° rotb	VM	n° violacion	BHE (±)
MC74	3,83	65,11	26	344,37	5	0	3	304,96	0	+
MC76	3,44	74,34	27	360,37	6	0	4	313,95	0	-
MC77	3,42	74,34	27	360,37	6	0	4	313,95	0	-
MC78	2,17	75,97	19	254,25	5	1	1	216,37	0	+
MC79	3,44	74,34	27	360,37	6	0	4	313,95	0	-
MC80	3,81	65,11	26	344,37	5	0	3	304,96	0	+
MC81	3,83	65,11	26	344,37	5	0	3	304,96	0	+
MC84	2,24	65,11	20	268,27	5	0	1	233,31	0	-
MC85	1,85	74,34	21	284,27	6	0	2	242,30	0	-
MC86	1,82	74,34	21	284,27	6	0	2	242,30	0	-
MC87	2,22	65,11	20	268,27	5	0	1	233,31	0	-
MC88	1,85	74,34	21	284,27	6	0	2	242,30	0	-
MC89	2,24	65,11	20	268,27	5	0	1	233,31	0	-
MC91	1,78	85,20	20	270,24	6	1	2	225,35	0	-
MC95	1,76	85,20	20	270,24	6	1	2	225,35	0	-
MC96	2,15	75,97	19	254,25	5	1	1	216,37	0	+
MC97	1,78	85,20	20	270,24	6	1	2	225,35	0	-
MC98	2,17	75,97	19	254,25	5	1	1	216,37	0	+
Deprenilo	2,26	3,24	13	173,26	1	0	3	185,84	0	+
Tacrina	3,05	38,92	15	198,27	2	2	0	191,53	0	+
Eserina	1,94	44,81	20	275,35	5	1	2	261,48	0	+

5.9.4. Propiedades fisicoquímicas y predicción de paso a través de BHE para los derivados de 3-(piridazin-3-il)cumarina

Como se observa en la **Tabla 50**, los derivados correspondientes a esta serie presentan una alta liposolubilidad. Los valores más elevados de LogP corresponden a aquellos derivados que presentan dos átomos de halógeno (Cl o Br) en su molécula. Para **MC150** y **MC151**, los valores de reparto octanol/agua superan el valor de 4.0.

En lo relativo a su área de superficie polar (TPSA), todos los derivados de 3-(piridazin-3-il)cumarina muestran valores muy similares entre sí y no muy superiores a

los presentados por la eserina, en comparación con otros derivados de cumarina descritos previamente en esta memoria.

Tabla 50. Propiedades moleculares de los derivados de de 3-(piridazin-3-il)cumarina calculadas utilizando el programa informático MolInspiration y predicción teórica de su paso a través de BHE utilizando el programa informático CBLigand-BBB

COMP.	LogP	TPSA	n° átom	PM	n° ON	n° OHNH	n° rotb	VM	n° violacion	BHE (±)
MC82	3,53	56,00	19	272,69	4	0	1	221,78	0	+
MC93	2,91	65,23	20	268,27	5	0	2	233,79	0	+
MC99	3,13	65,23	20	288,69	5	0	2	230,76	0	+
MC100	2,51	74,46	21	284,27	6	0	3	242,77	0	+
MC101	3,11	65,23	20	288,69	5	0	2	230,76	0	+
MC102	3,50	56,00	19	272,69	4	0	1	221,78	0	+
MC103	3,13	65,23	20	288,69	5	0	2	230,76	0	+
MC104	3,53	56,00	19	272,69	4	0	1	221,78	0	+
MC105	2,49	74,46	21	284,27	6	0	3	242,77	0	+
MC106	2,88	65,23	20	268,27	5	0	2	233,79	0	+
MC107	2,51	74,46	21	284,27	6	0	3	242,77	0	+
MC108	2,91	65,23	20	268,27	5	0	2	233,79	0	+
MC124	3,10	55,99	18	258,66	4	0	1	205,22	0	+
MC143	3,23	55,99	18	303,12	4	0	1	209,57	0	+
MC144	3,66	55,99	19	317,14	4	0	1	226,13	0	+
MC145	3,27	65,23	20	333,14	5	0	2	235,11	0	+
MC146	3,66	55,99	19	317,14	4	0	1	226,13	0	+
MC147	3,27	65,23	20	333,14	5	0	2	235,11	0	+
MC148	3,63	55,99	19	317,14	4	0	1	226,13	0	+
MC149	3,24	65,23	20	333,14	5	0	2	235,11	0	+
MC150	4,02	55,99	19	382,01	4	0	1	227,45	0	+
MC151	4,02	55,99	19	382,01	4	0	1	227,45	0	+
MC152	3,99	55,99	19	382,01	4	0	1	227,45	0	+
MC153	3,89	55,99	19	337,56	4	0	1	223,10	0	+
MC154	3,86	55,99	19	337,56	4	0	1	223,10	0	+
MC155	3,89	55,99	19	337,56	4	0	1	223,10	0	+
MC156	3,89	55,99	19	337,56	4	0	1	223,10	0	+
MC157	3,86	55,99	19	337,56	4	0	1	223,10	0	+
MC158	3,75	55,99	19	293,11	4	0	1	218,75	0	+
MC159	3,73	55,99	19	293,11	4	0	1	218,75	0	+
Deprenilo	2,26	3,24	13	173,26	1	0	3	185,84	0	+
Tacrina	3,05	38,92	15	198,27	2	2	0	191,53	0	+
Eserina	1,94	44,81	20	275,35	5	1	2	261,48	0	+

Ninguno de los derivados presenta ninguna violación de la regla de Lipinski por lo que teóricamente pueden atravesar membranas celulares y tener buena

biodisponibilidad. Además, según la predicción teórica de paso a través de BHE, todos ellos son capaces de acceder al SNC.

5.9.5. Propiedades fisicoquímicas y predicción de paso a través de BHE para los derivados 3-benzamidocumarina

Los derivados más liposolubles de esta serie, son aquellos que presentan uno o dos sustituyentes metilo o halógeno en su molécula. **MJM249**, **MJM253**, **MJM260**, **MJM280** y **MJM324** presentan valores de LogP superiores a 3,00. Para 3-(3',4'-diclorobenzamido)cumarina (**MJM254**), el compuesto más liposoluble, ese valor es superior a 4,00 (**Tabla 51**). Sin embargo, a pesar de que ninguno de ellos presenta violaciones de las reglas de Lipinski, la predicción teórica indica que estos derivados de cumarina no son capaces de atravesar la BHE.

Tabla 51. Propiedades moleculares de los derivados 3-benzamidocumarina calculadas utilizando el programa informático MolInspiration y predicción teórica de su paso a través de BHE utilizando el programa informático CBLigand-BBB

COMP.	LogP	TPSA	n° átom	PM	n° ON	n° OHNH	n° rotb	VM	n° violacion	BHE (±)
MJM223	2,46	87,01	26	355,35	7	1	5	308,02	0	-
MJM229	2,17	107,24	27	371,35	8	2	5	316,04	0	-
MJM246	2,83	59,31	20	265,27	4	1	2	231,38	0	-
MJM247	2,89	68,54	22	295,29	5	1	3	256,93	0	-
MJM249	3,28	59,31	21	279,30	4	1	2	247,94	0	-
MJM252	2,48	77,78	24	325,32	6	1	4	282,47	0	-
MJM253	3,51	59,31	21	299,71	4	1	2	244,92	0	-
MJM254	4,12	59,31	22	334,16	4	1	2	258,45	0	-
MJM255	2,79	105,13	23	310,27	7	1	3	254,72	0	-
MJM256	2,54	79,54	21	281,27	5	2	2	239,40	0	-
MJM257	2,60	88,77	23	311,29	6	2	3	264,95	0	-
MJM258	2,19	98,01	25	341,32	7	2	4	290,49	0	-
MJM259	2,99	79,54	22	295,29	5	2	2	255,96	0	-
MJM260	3,22	79,54	22	315,71	5	2	2	252,94	0	-
MJM261	2,50	125,36	24	326,26	8	2	3	262,73	0	-
MJM280	3,83	79,54	23	350,16	5	2	2	266,47	0	-
MJM324	3,71	59,31	22	293,32	4	1	2	264,50	0	-
Deprenilo	2,26	3,24	13	173,26	1	0	3	185,84	0	+
Tacrina	3,05	38,92	15	198,27	2	2	0	191,53	0	+
Eserina	1,94	44,81	20	275,35	5	1	2	261,48	0	+

5.9.6. Propiedades fisicoquímicas y predicción de paso a través de BHE de los derivados 3-ciclohexilamidocumarina y 3-heteroarilamidocumarina

Como se puede ver en la **Tabla 52** estos derivados presentan unas propiedades moleculares que, en general, son comparables a las presentadas por la eserina o tacrina. Sin embargo, y aunque no presentan violaciones de la regla de Lipinski, la predicción teórica de paso a través de BHE, resultó negativa excepto para la 3-ciclohexilamidocumarina (**MJM195**).

Tabla 52. Propiedades moleculares de los derivados de 3-ciclohexilamidocumarina y 3-heteroarilamidocumarina calculadas utilizando el programa informático MolInspiration y predicción teórica de su paso a través de BHE utilizando el programa informático CBLigand-BBB.

COMP.	LogP	TPSA	n° átom	PM	n° ON	n° OHNH	n° rotb	VM	n° violacion	BHE (±)
MJM195	3,41	59,31	20	271,32	4	1	2	249,97	0	+
MJM197	3,12	79,54	21	287,32	5	2	2	257,99	0	-
MJM296	2,73	59,31	19	271,30	4	1	2	222,09	0	-
MJM297	2,44	79,54	20	287,30	5	2	2	230,11	0	-
MJM312	2,09	72,45	19	255,23	5	1	2	212,95	0	-
MJM313	1,78	92,68	20	271,23	6	2	2	271,23	0	-
MJM320	1,60	72,20	20	266,26	5	1	2	227,23	0	-
MJM321	1,31	92,43	21	282,26	6	2	2	235,24	0	-
Deprenilo	2,26	3,24	13	173,26	1	0	3	185,84	0	+
Tacrina	3,05	38,92	15	198,27	2	2	0	191,53	0	+
Eserina	1,94	44,81	20	275,35	5	1	2	261,48	0	+

5.9.7. Propiedades fisicoquímicas y predicción de paso a través de BHE de los derivados 7-benzamido-4-metilcumarina

7-Benzamido-4-metilcumarina (**MJM272**) es el derivado menos substituido de esta serie y presenta unas propiedades físico-químicas adecuadas para permitir su paso a través de membranas celulares; como se puede observar en la **Tabla 53**, la predicción teórica indica que puede atravesar la BHE. De igual forma que se describió previamente para otras series de derivados de cumarina, la predicción es también favorable para los derivados con grupos metilo (**MJM275**) o halógeno (**MJM277**) pero, aunque ninguno de los derivados de la serie presenta violaciones de la regla Lipinski, según la predicción teórica, la introducción de grupos metoxilo (**MJM273** y **MJM276**) o nitro (**MJM279**) en la molécula origina derivados que no pueden atravesar la BHE.

Tabla 53. Propiedades moleculares de los derivados 7-benzamidocumarina calculadas utilizando el programa informático MolInspiration y predicción teórica de su paso a través de BHE utilizando el programa informático CBLigand-BBB.

COMP.	LogP	TPSA	n° átom	PM	n° ON	n° OHNH	n° rotb	VM	n° violación	BHE (±)
MJM272	3,26	59,31	21	279,30	4	1	2	247,94	0	+
MJM273	3,31	68,54	23	309,32	5	1	3	273,49	0	-
MJM275	3,71	59,31	22	293,32	4	1	2	264,50	0	+
MJM276	2,90	77,78	25	339,35	6	1	4	299,03	0	-
MJM277	3,94	59,31	22	313,74	4	1	2	261,48	0	+
MJM279	3,22	105,13	24	324,29	7	1	3	271,28	0	-
Deprenilo	2,26	3,24	13	173,26	1	0	3	185,84	0	+
Tacrina	3,05	38,92	15	198,27	2	2	0	191,53	0	+
Eserina	1,94	44,81	20	275,35	5	1	2	261,48	0	+

5.9.8. Propiedades fisicoquímicas y predicción de paso a través de BHE de los derivados de 7-alquilamido-4-metilcumarina y de 7-heteroarilamido-4-metilcumarina

Como se puede observar en la **Tabla 54**, los derivados de cumarina correspondientes a estas series presentan unas propiedades físicoquímicas similares a los fármacos de referencia.

Tabla 54. Propiedades moleculares de los derivados de 7-alquilamido-4-metilcumarina y de 7-heteroarilamido-4-metilcumarina calculadas utilizando el programa informático MolInspiration y predicción teórica de su paso a través de BHE utilizando el programa informático CBLigand-BBB.

COMP.	LogP	TPSA	n° átom	PM	n° ON	n° OHNH	n° rotb	VM	n° violación	BHE (±)
MJM286	1,59	59,31	16	217,22	4	1	1	193,10	0	-
MJM340	3,16	59,31	20	285,32	4	1	2	238,65	0	+
MJM341	2,51	72,45	20	269,26	5	1	2	229,51	0	-
MJM430	2,42	59,31	17	231,25	4	1	2	209,90	0	+
MJM508	2,67	59,31	18	245,28	4	1	2	226,48	0	-
MJM509	3,20	59,31	19	259,31	4	1	3	243,29	0	-
MJM511	3,52	59,31	20	273,33	4	1	3	259,52	0	-
Deprenilo	2,26	3,24	13	173,26	1	0	3	185,84	0	+
Tacrina	3,05	38,92	15	198,27	2	2	0	191,53	0	+
Eserina	1,94	44,81	20	275,35	5	1	2	261,48	0	+

Únicamente el derivado más sencillo, 7-formamido-4-metilcumarina (**MJM286**) presenta un valor de LogP inferior a estos. Los valores de TPSA son iguales para los diferentes derivados de estas series, con la excepción de 7-(furan-2-ilamido)-4-metilcumarina (**MJM341**) que tiene un valor superior. Ninguno de los derivados de

estas series presenta violaciones de la regla de Lipinski; sin embargo la predicción teórica de paso a través de BHE resultó favorable solo para 7-(tiofen-2-ilamido)-4-metilcumarina (**MJM340**) y 7-acetamido-4-metilcumarina (**MJM430**).

5.9.9. Propiedades fisicoquímicas y predicción de paso a través de BHE de 3,3'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)bis(7,8-dihidroxicumarina) y de los derivados de 4,4'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina

Como se puede observar en la **Tabla 55**, estos derivados de biscumarina presentan valores de LogP y VM similares a la curcumina pero mayor valor de TPSA. Aunque ninguno de estos derivados presenta violaciones de la regla de Lipinski, el elevado valor de TPSA, junto con su alto VM, podrían explicar el resultado negativo obtenido en la predicción teórica de paso a través de BHE.

Tabla 55. Propiedades moleculares de 3,3'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)bis(7,8-dihidroxicumarina) y de los derivados de 4,4'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina calculadas utilizando el programa informático MolInspiration, y predicción teórica de su paso a través de BHE utilizando el programa informático CBLigand-BBB.

COMP.	LogP	TPSA	n° átom	PM	n° ON	n° OHNH	n° rotb	VM	n° violacion	BHE (±)
H1i2	2,49	178,63	35	476,39	10	5	5	385,86	0	-
A1A	2,40	178,63	35	476,39	10	5	5	385,86	0	-
B1B	2,03	178,63	35	476,39	10	5	5	385,86	0	-
Curcumina	2,30	93,07	27	368,38	6	2	8	332,18	0	-
Deprenilo	2,26	3,24	13	173,26	1	0	3	185,84	0	+
Tacrina	3,05	38,92	15	198,27	2	2	0	191,53	0	+
Eserina	1,94	44,81	20	275,35	5	1	2	261,48	0	+

5.9.10. Propiedades fisicoquímicas y predicción de paso a través de BHE de los derivados de 3-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina y 4-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina

En la **Tabla 56** se observa que estos derivados de cumarina presentan un valor de LogP inferior a la curcumina pero comparable a la eserina, fármaco de referencia. Por el contrario, los otros parámetros fisicoquímicos estudiados tienen valores muy superiores. La introducción de un residuo aminoacídico origina derivados (**I1I**, **J1J**, **K1K**, **L1L**) en los que disminuye el LogP y aumenta la TPSA, presentando 3 violaciones de la regla de Lipinski. Para todos los derivados de estas series, independientemente de las

violaciones de la regla de Lipinski, la predicción teórica indica que sus propiedades no son adecuadas para permitir su paso a través de BHE.

Tabla 56. Propiedades moleculares de los derivados de de 3-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina calculadas utilizando el programa informático MolInspiration. y predicción teórica de su paso a través de BHE utilizando el programa informático CBLigand-BBB.

COMP.	LogP	TPSA	n° átom	PM	n° ON	n° OHNH	n° rotb	VM	n° violacion	BHE (±)
H1i3	1,86	165,49	31	424,36	9	5	6	349,34	0	-
H1i5	1,45	165,49	31	424,36	9	5	6	349,34	0	-
H1J2	1,48	165,49	31	424,36	9	5	6	349,34	0	-
H1J4	1,43	165,49	31	424,36	9	5	6	349,34	0	-
H1K3	1,63	165,49	31	424,36	9	5	6	349,34	0	-
H1K5	1,23	165,49	31	424,36	9	5	6	349,34	0	-
H1L2	1,25	165,49	31	424,36	9	5	6	349,34	0	-
H1L3	1,20	165,49	31	424,36	9	5	6	349,34	0	-
A1I	1,86	165,49	31	424,36	9	5	6	349,69	0	-
A1J	1,45	165,49	31	424,36	9	5	6	349,69	0	-
A1K	1,48	165,49	31	424,36	9	5	6	349,69	0	-
A1L	1,43	165,49	31	424,36	9	5	6	349,69	0	-
B1I	1,63	165,49	31	424,36	9	5	6	349,69	0	-
B1K	1,25	165,49	31	424,36	9	5	6	349,69	0	-
B1L	1,20	165,49	31	424,36	9	5	6	349,69	0	-
I1I	-0,91	208,59	38	523,49	11	7	11	447,19	3	-
J1J	-0,51	208,59	38	523,49	11	7	11	447,19	3	-
K1K	-1,14	208,59	38	523,49	11	7	11	447,19	3	-
L1L	-0,73	208,59	38	523,49	11	7	11	447,19	3	-
Curcumina	2,30	93,07	27	368,38	6	2	8	332,18	0	-
Deprenilo	2,26	3,24	13	173,26	1	0	3	185,84	0	+
Tacrina	3,05	38,92	15	198,27	2	2	0	191,53	0	+
Eserina	1,94	44,81	20	275,35	5	1	2	261,48	0	+

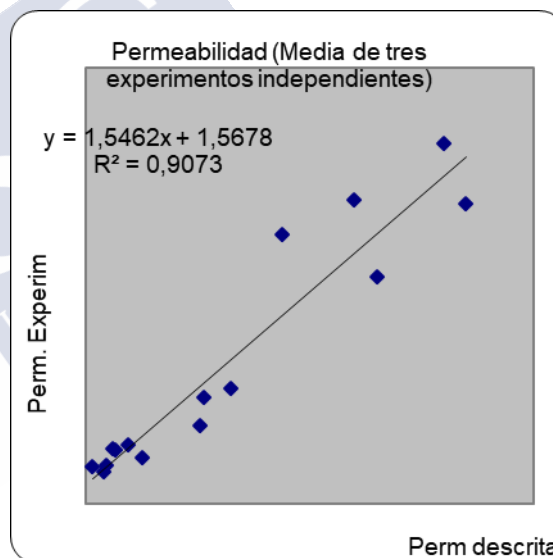
5.10. CAPACIDAD *IN VITRO* DE ATRAVESAR LA BHE

Se seleccionaron algunos derivados de cumarina, correspondientes a las series de 3-fenilcumarina y 3-benzamidocumarina, para evaluar *in vitro* su capacidad para atravesar la BHE, una propiedad imprescindible para que puedan ejercer su acción terapéutica en el SNC.

La permeabilidad *in vitro* (P_e) fue determinada usando la metodología de membranas artificiales paralelas (PAMPA: *Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*). Los compuestos fueron disueltos empleando una mezcla de PBS y etanol en proporción 70:30. El método se validó con 11 fármacos comerciales de los que se conocía su grado de penetración en el SNC (**Tabla 57**), obteniendo una buena relación lineal entre la permeabilidad experimental y la descrita (**Gráfica 31**).

Tabla 57. Resultados bibliográficos y experimentales de paso a través de BHE de diversos fármacos conocidos.

	Bibl	Experimental		
Testosterona	17,0	24,1	±	1,1
Verapamilo	16,0	28,9	±	1,6
Imipramina	13,0	18,2	±	0,8
Desipramina	12,0	24,4	±	0,3
Promazina	8,8	21,6	±	0,8
Corticosterona	5,1	6,2	±	0,2
Piroxicam	2,5	3,6	±	0,1
Hidrocortisona	1,9	4,7	±	0,2
Cafeína	1,3	4,3	±	0,1
Aldosterona	1,2	4,4	±	0,2
Ofloxacino	0,8	2,5	±	0,1



Gráfica 31. Resultados de permeabilidad (media de tres experimentos independientes).

A partir de esa correlación se pudieron establecer los límites para predecir el paso a través de la BHE. Las moléculas con un valor de P_e superior a $7,8 \cdot 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ serían capaces de penetrar en el cerebro (SNC +), mientras que no lo harían (SNC -) aquellas moléculas para las que su permeabilidad *in vitro* fuese menor de $4,8 \cdot 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$.

Tabla 58. Evaluación in vitro de la penetración en el SNC “Permeabilidad experimental ($P_e \cdot 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$)” empleando la metodología PAMPA. Los resultados se expresan como la media de la predicción experimental de paso a través de BHE de al menos 3 experimentos independientes $\pm e.e.m.$

COMPUESTO	Pe	Predicción
CUM11	$2,60 \pm 0,03$	SNC -
CUM21	$16,20 \pm 0,10$	SNC +
CUM21C	$2,30 \pm 0,01$	SNC -
CUM41	$3,20 \pm 0,10$	SNC -
CUM71	$2,10 \pm 0,03$	SNC -
CUM81	$3,60 \pm 0,10$	SNC -
CUM91	$2,90 \pm 0,02$	SNC -
MJM223	$21,69 \pm 1,46$	SNC +
MJM229	$4,61 \pm 0,31$	SNC -
MJM247	$30,07 \pm 2,02$	SNC +
MJM257	$11,53 \pm 0,77$	SNC +
MJM258	$6,85 \pm 0,46$	SNC +/-

De todos los compuestos ensayados, el compuesto **CUM21** (correspondiente a la serie de las 3-fenilcumarinas) y los compuestos **MJM247**, **MJM257** y **MJM223** (con estructura de 3-benzamidocumarina) mostraron buenos valores de permeabilidad. El compuesto **MJM247** presentó un valor de P_e superior al que presenta el verapamilo ($P_e = 28,9 \cdot 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$), fármaco que se utiliza generalmente como un estándar de alta permeabilidad.

A la vista de los resultados obtenidos, estos compuestos, al ser capaces de atravesar la BHE también serían capaces de alcanzar sus dianas terapéuticas en el cerebro, una condición indispensable para formar parte de los fármacos útiles para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.

5.11. ESTUDIOS *IN VIVO*: TEST DE CAMPO ABIERTO

A la vista de los resultados anteriormente descritos para los derivados de cumarina estudiados y considerando su actividad *in vitro* como inhibidores de la MAO-B, se seleccionaron los derivados más activos de cada serie para la realización de los estudios *in vivo* mediante el test de campo abierto (OFT)

Los compuestos seleccionados fueron, **CUM21**, con estructura 3-fenilcumarina, **MJM470**, con estructura de 3-heteroarilcumarina, **MJM272** y **MJM511** con estructura de 7-amidocumarina y **MC151** con estructura de 3-piridazinilcumarina.

Los estudios se realizaron tanto con ratones no reserpinizados como con ratones reserpinizados. La reserpina bloquea el VMAT impidiendo el almacenamiento adecuado de la DA sintetizada. Esto provoca la depleción de las terminaciones nerviosas dopaminérgicas y, entre ellas, las de la vía nigroestriada, dando lugar a hipocinesia en los animales de experimentación, por lo que se utiliza como modelo de la EP. Hay que tener en cuenta que la reserpina es poco selectiva y también afecta al almacenamiento vesicular de NA y 5-HT.

Para los ratones no reserpinizados se evaluó la posible modificación de la actividad motora provocada por el R-(-)-deprenilo o por los derivados de cumarina antes mencionados. Para los ratones reserpinizados, se estudió la posible potenciación del efecto de la mezcla levodopa:benserazida (LD:B), ya que si estos compuestos actúan como inhibidores de la MAO-B *in vivo* a la dosis administrada, al inhibir la metabolización de la DA por la MAO-B, el tiempo de permanencia de la DA en el espacio sináptico estriatal debe de aumentar y, consiguientemente, la actividad motora medida como la distancia recorrida en una hora, la velocidad de movimiento y el porcentaje de tiempo en movimiento.

5.11.1. Test de campo abierto en ratones no reserpinizados

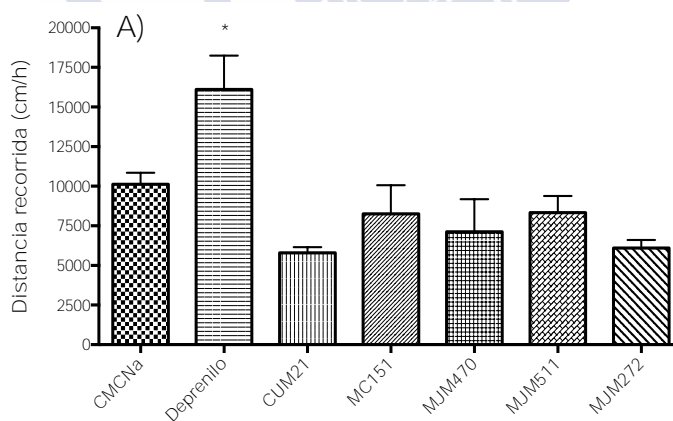
Como se puede observar en la **Gráfica 32**, la administración de R-(-)-deprenilo 10 mg/Kg (fármaco de referencia) en ratones no reserpinizados, modificó la distancia recorrida de forma estadísticamente significativa ($16.109 \text{ cm} \pm 1080,61$, $P < 0,05$) frente al grupo control correspondiente ($10.114 \text{ cm} \pm 678,46$) de animales tratados con el vehículo (CMCNa 1%) (**Gráfica 32 - A**).

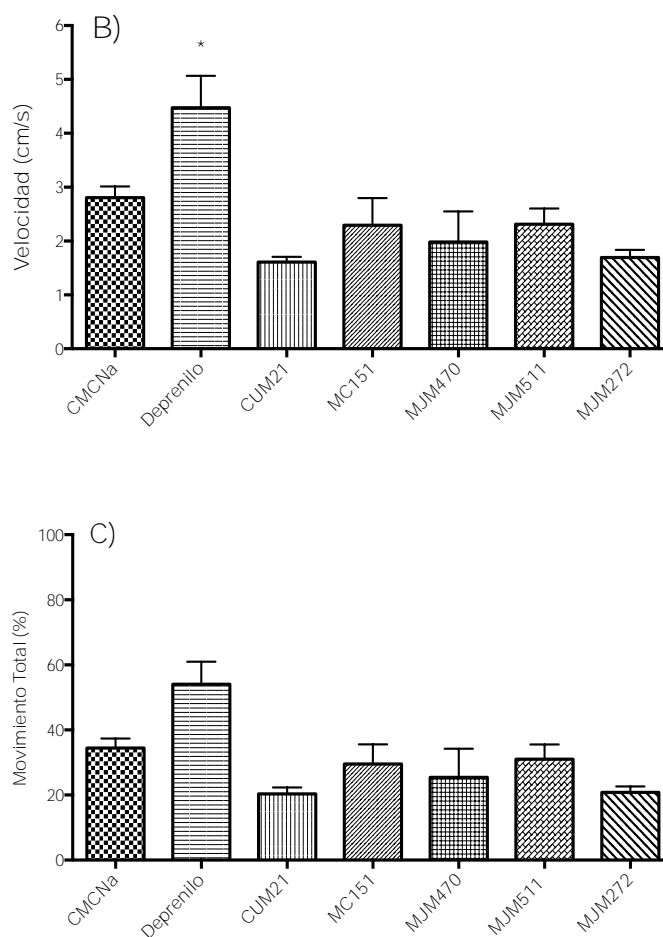
El R-(-)-deprenilo también incrementó de forma estadísticamente significativa la velocidad frente al grupo control (deprenilo: 4,48 cm/s \pm 0,30, $P < 0,05$ vs control: 2,81 cm/s \pm 0,19) (**Gráfica 32 - B**).

Para el tiempo en movimiento respecto al tiempo total (movimiento total (%)), aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas, se vio que el R-(-)-deprenilo mostraba una tendencia a incrementarlo (54,02 % \pm 3,62) frente al control (34,44 % \pm 2,31) (**Gráfica 32 - C**).

En los animales tratados con los nuevos derivados de cumarina anteriormente mencionados, a dosis de 100 mg/Kg, los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas frente al grupo control ni una clara tendencia a aumentar ninguno de los parámetros evaluados.

Sí se pudo observar, sin embargo, una ligera tendencia de los compuestos **CUM21** y **MJM272** a disminuir levemente la distancia recorrida, la velocidad y el tiempo en movimiento, pero esta no fue en ningún caso estadísticamente significativa (**Gráfica 32**).

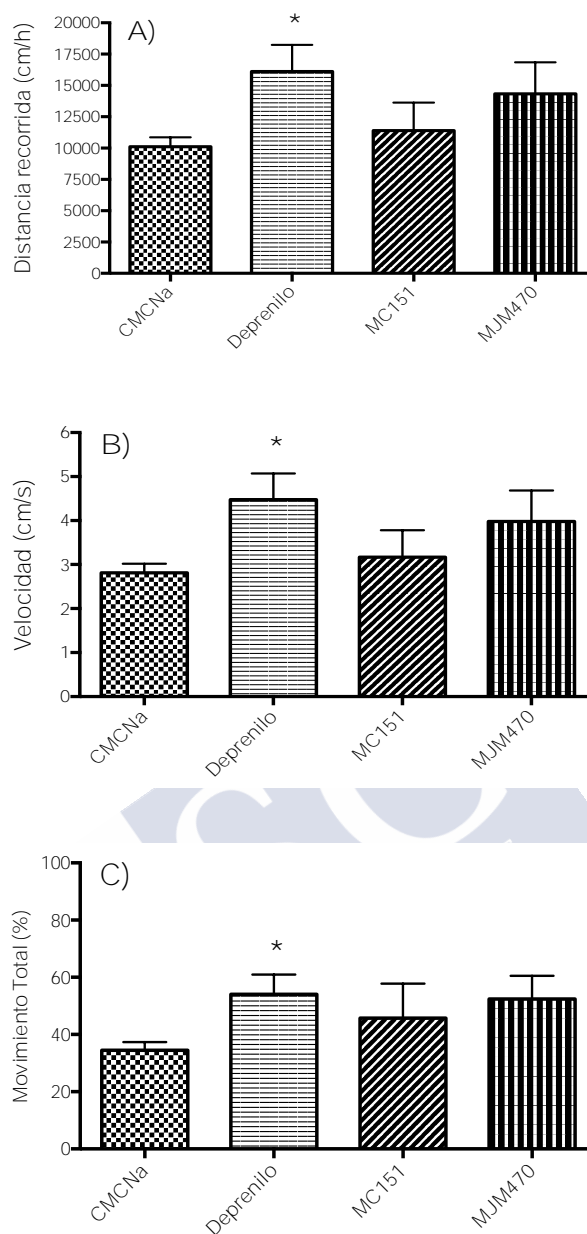




Gráfica 32. Test de campo abierto (OFT) en ratones no reserpinizados. *R(-)-deprenilo* (10 mg/Kg), **CUM21**, **MC151**, **MJM470**, **MJM511**, **MJM272** (100 mg/Kg). (A) Distancia recorrida en cm durante una hora, (B) velocidad media en cm/s y (C) movimiento total (%).

En función a los resultados obtenidos en animales reserpinizados se decidió evaluar en animales no reserpinizados una dosis de 10 mg/Kg. Para el compuesto **MJM470**, administrado a dosis de 10 mg/Kg, se vio una tendencia a incrementar la distancia recorrida (**MJM470**: 14.331 cm \pm 961,34), la velocidad (**MJM470**: 3,98 cm/s \pm 0,27) y el tiempo en movimiento (**MJM470**: 52,43 % \pm 3,52), si bien la diferencia con el grupo control no es, en ningún caso, estadísticamente significativa, como se puede observar en la **Gráfica 33 (A-C)**.

En el caso del compuesto **MC151**, al administrado a dosis de 10mg/Kg, sin embargo, esta tendencia a incrementar los parámetros evaluados no está tan clara, mostrando unos resultados similares al del grupo control (**Gráfica 33 (A-C)**).



Gráfica 33. Test de campo abierto (OFT) en ratones no reserpinizados. *R*-(-)-deprenilo, **MJM470** y **MC151** (10 mg/Kg). (A) Distancia recorrida en cm durante una hora, (B) velocidad media en cm/s y (C) el movimiento total (%).

Una vez finalizados los ensayos con ratones no reserpinizados, estos se mantuvieron en observación durante cinco días, transcurridos los cuales, se sacrificaron. Durante estos días ningún ratón falleció ni se observaron signos físicos visibles de toxicidad.

A la vista de los resultados obtenidos podemos apreciar que, las nuevas moléculas, a diferencia del *R*-(-)-deprenilo, no modificaron la actividad en campo abierto de los animales de experimentación utilizados.

5.11.2. Test de campo abierto en ratones reserpinizados

Como se puede observar en la **Gráfica 34**, la asociación de R-(-)-deprenilo (10 mg/Kg) con LD:B (100:25 mg/Kg) modificó de forma estadísticamente significativa la distancia recorrida ($6.848 \text{ cm} \pm 459,37$, $P < 0,001$) frente al grupo control (CMCNa 1% + CMCNa 1%) ($1.700 \text{ cm} \pm 114,24$) (**Gráfica 34 - A**).

La distancia recorrida respecto al vehículo no se vio incrementada ni en los animales tratados con CMCNa + LD:B, ni en los tratados con R-(-)-deprenilo + CMCNa. Es la combinación de R-(-)-deprenilo + LD:B la que incrementó la distancia recorrida por los animales en el experimento de campo abierto como se puede observar en la gráfica (**Gráfica 34 - A**).

Al igual que sucedió con el fármaco de referencia (R-(-)-deprenilo), los compuestos **MC151** y **MJM470** administrados a dosis de 100 mg/Kg, también en combinación con LD:B, incrementaron la distancia recorrida por los animales de forma estadísticamente significativa (**MC151**: $4.995 \text{ cm} \pm 335,07$, $P < 0,05$; **MJM470**: $9.201 \text{ cm} \pm 617,21$, $P < 0,001$) frente al grupo control. Cabe señalar que para los ratones tratados con el compuesto **MJM470**, el valor de la distancia recorrida por los ratones reserpinizados fue incluso superior al del fármaco de referencia (**Gráfica 34 - A**).

En el caso del compuesto **MJM272** a 100 mg/Kg asociado a LD:B, si bien el resultado no mostró un incremento estadísticamente significativo, sí se pudo observar una tendencia a aumentar la distancia recorrida (**MJM272**: $4.115 \text{ cm} \pm 276,04$) frente al grupo control (**Gráfica 34 - A**).

La asociación de R-(-)-deprenilo con LD:B incrementó de forma estadísticamente significativa la velocidad de los animales ($1,77 \text{ cm/s} \pm 0,12$, $P < 0,001$) frente al control ($0,47 \text{ cm/s} \pm 0,03$). Este efecto no se apreció, sin embargo, en los animales tratados solo con R-(-)-deprenilo o solo con LD:B (**Gráfica 34 - B**).

De la misma forma que con la distancia recorrida, en los animales tratados con CMCNa + LD:B y en los tratados con R-(-)-deprenilo + CMCNa, no se experimentaron cambios en su velocidad media al compararlos con los que fueron tratados únicamente con el vehículo (**Gráfica 34 - B**).

Los compuestos **MC151** y **MJM470** administrados a dosis de 100 mg/Kg, en asociación con LD:B, al igual que sucedió con el fármaco de referencia, también mostraron un incremento de la velocidad de forma estadísticamente significativa (**MC151**: 1,39 cm/s \pm 0,09, $P < 0,05$; **MJM470**: 2,56 cm/s \pm 0,17, $P < 0,001$) frente al grupo control (**Gráfica 34 - B**).

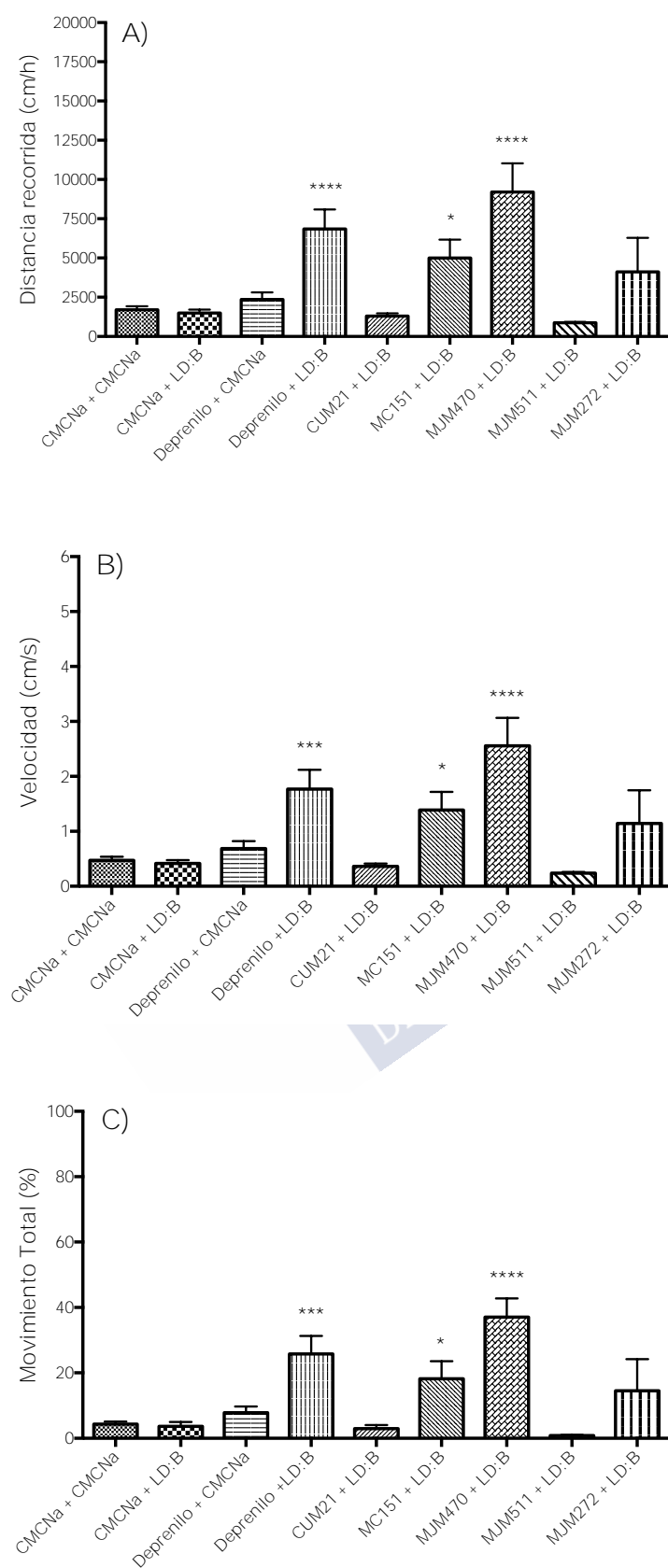
El compuesto **MJM272** administrado a dosis de 100 mg/Kg conjuntamente con LD:B, no mostró un incremento estadísticamente significativo, aunque sí se pudo observar una tendencia a aumentar la velocidad (1,15 cm \pm 0,08) frente al grupo control (**Gráfica 34 - B**).

De forma similar a la observada para los dos parámetros comentados previamente, el tratamiento únicamente con R-(-)-deprenilo o con LD:B tampoco logró modificar el tiempo en movimiento de los animales en el test de campo abierto cuando se compararon con el control (**Gráfica 34 - C**).

El R-(-)-deprenilo en asociación con LD:B incrementó de forma estadísticamente significativa el tiempo en movimiento de los animales (25,78% \pm 1,73, $P < 0,001$) respecto al control (4,30% \pm 0,29) (**Gráfica 34 - C**).

También los derivados de cumarina **MC151** y **MJM470** administrados a dosis de 100 mg/Kg en terapia asociada con LD:B, mostraron un incremento del tiempo en movimiento de forma estadísticamente significativa (**MC151**: 18,20 % \pm 1,22, $P < 0,05$; **MJM470**: 37,04 % \pm 2,48, $P < 0,001$) frente al grupo control (**Gráfica 34 - C**).

Para el derivado **MJM272** administrado a dosis de 100 mg/Kg, siempre en asociación con LD:B, aunque el resultado no mostró un incremento estadísticamente significativo, sí se pudo observar una tendencia a incrementar el tiempo en movimiento (20,77 \pm 1,39) frente al grupo control (**Gráfica 34 - C**).



Gráfica 34. Test de campo abierto (OFT) en ratones reserpinizados. *R*-(-)-deprenilo (10 mg/Kg), *CUM21*, *MC151*, *MJM470*, *MJM511* y *MJM272* (100 mg/Kg). (A) Distancia recorrida en cm durante una hora, (B) velocidad media en cm/s y (C) movimiento total (%).

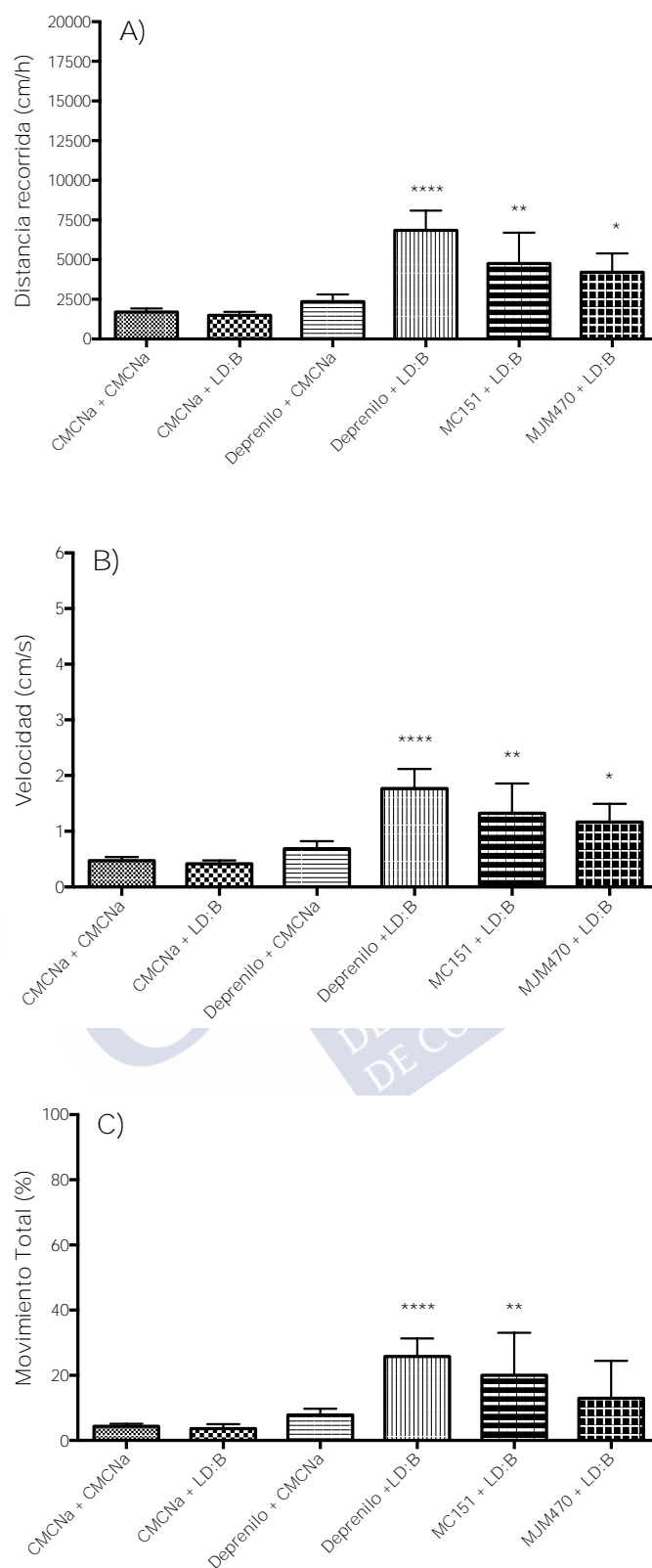
De forma general, en nuestros ensayos y bajo nuestras condiciones experimentales, ni el R-(-)-deprenilo ni la LD:B administrados junto al vehículo, modificaron el comportamiento de los animales reserpinizados en el ensayo de campo abierto (**Gráfica 34**).

Los derivados de cumarina **MJM470** y **MC151** se administraron, además, a dosis más baja, 10 mg/Kg, y siempre en combinación con LD:B. Como se puede observar en la **Gráfica 35**, a esta dosis también produjeron un incremento estadísticamente significativo en la distancia recorrida (**MJM470**: $4.201 \text{ cm} \pm 281,81$, $P < 0,05$; **MC151**: $4.762 \text{ cm} \pm 319,44$, $P < 0,01$) frente al grupo control (CMCNa 1% + CMCNa 1%) ($1.703 \text{ cm} \pm 114,24$) (**Gráfica 35 - A**).

El mismo tratamiento permitió observar un incremento estadísticamente significativo de la velocidad (**MJM470**: $1,16 \text{ cm/s} \pm 0,08$, $P < 0,05$; **MC151**: $1,32 \text{ cm/s} \pm 0,09$, $P < 0,01$) frente al grupo control ($0,47 \text{ cm/s} \pm 0,03$) (**Gráfica 35 - B**).

Los compuestos **MJM470** y **MC151** evidenciaron una modificación cualitativamente similar al R-(-)-deprenilo y estadísticamente significativa tanto en la distancia recorrida como en la velocidad media. Sin embargo, al analizar el tiempo en movimiento de los animales que recibieron con los compuestos **MJM470** y **MC151** a una dosis de 10 mg/Kg y con LD:B, se pudo observar que solo el **MC151** mostró un incremento estadísticamente significativo del mismo (**MC151**: $20,02 \pm 1,34$, $P < 0,01$) frente al grupo control (control: $4,30 \% \pm 0,29$). En el caso del compuesto **MJM470**, se pudo observar una tendencia a incrementar este parámetro que no resultó estadísticamente significativa (**MJM470**: $12,98 \% \pm 0,87$) respecto al grupo control (control: $4,30 \% \pm 0,29$) (**Gráfica 35 - C**).

En base a los resultados previamente descritos, los derivados de cumarina **MJM470** y **MC151** resultaron ser los más activos, demostrando un incremento en los parámetros evaluados en el test de campo abierto en ratones reserpinizados, tanto cuando se administra a los animales una dosis de 100 mg/Kg como cuando estos reciben una dosis de 10 mg/Kg.



Gráfica 35. Test de campo abierto (OFT) en ratones reserpinizados. *R*-(-)-deprenilo, **MJM470** y **MC151** (10 mg/Kg). (A) Distancia recorrida en cm durante una hora, (B) velocidad media en cm/s y (C) el movimiento total (%).

5.12. ESTUDIOS *IN VIVO*: TEST DE RECONOCIMIENTO DE OBJETO

A la vista de los resultados *in vitro* anteriormente descritos para los derivados de cumarina y considerando su actividad como inhibidor de AChE, el compuesto **MJM255** con estructura de 3-benzamidocumarina, se seleccionó para la realización de los estudios *in vivo* mediante el test de reconocimiento de objetos (ORT).

Los estudios se realizaron en dos grupos diferentes: ratones sin tratamiento previo y ratones tratados previamente con el antagonista de receptores muscarínicos escopolamina (1 mg/Kg). En el primer caso, se evaluó la conducta de los animales frente a un entorno nuevo en condiciones normales. En el caso de los ratones tratados previamente con escopolamina, se evaluó si el derivado de cumarina **MJM255** actúa como inhibidor de la AChE *in vivo* y, si a la dosis administrada, es capaz de inhibir la metabolización de la ACh por la AChE. De esta forma, se podría aumentar el tiempo de permanencia de la ACh en el espacio sináptico, lo que aumentaría su concentración y podría revertir el efecto de la escopolamina. Siempre teniendo en cuenta que en la EA se produce una destrucción de neuronas colinérgicas que conduce a la disminución de los niveles de este neurotransmisor.

La eserina, también llamada fisostigmina, es un alcaloide amina terciaria que se encuentra de forma natural en la semilla del *Fisostigma venenosum* L. conocida como haba de Calabar o nuez de Eseré. Este fármaco posee un sustituyente éster carbamílico y grupos básicos que se unen al sitio aniónico de la AChE. La transferencia del grupo carbamoil al grupo hidroxilo de la serina del sitio esteárico de la enzima es igual a la observada para la ACh, pero la enzima carbamilada se hidroliza mucho más lentamente, recuperando su actividad enzimática tras varios minutos en lugar de en microsegundos. La eserina se hidroliza tanto a nivel central y como a nivel periférico y la lenta recuperación de la enzima carbamilada implica que tenga un efecto bastante prolongado, incrementando la transmisión colinérgica.

Los parámetros evaluados en los diferentes grupos de tratamiento fueron: periodo de latencia, frecuencia y tiempo en zona.

5.12.1. Tiempo de latencia en ratones sin tratamiento previo con escopolamina

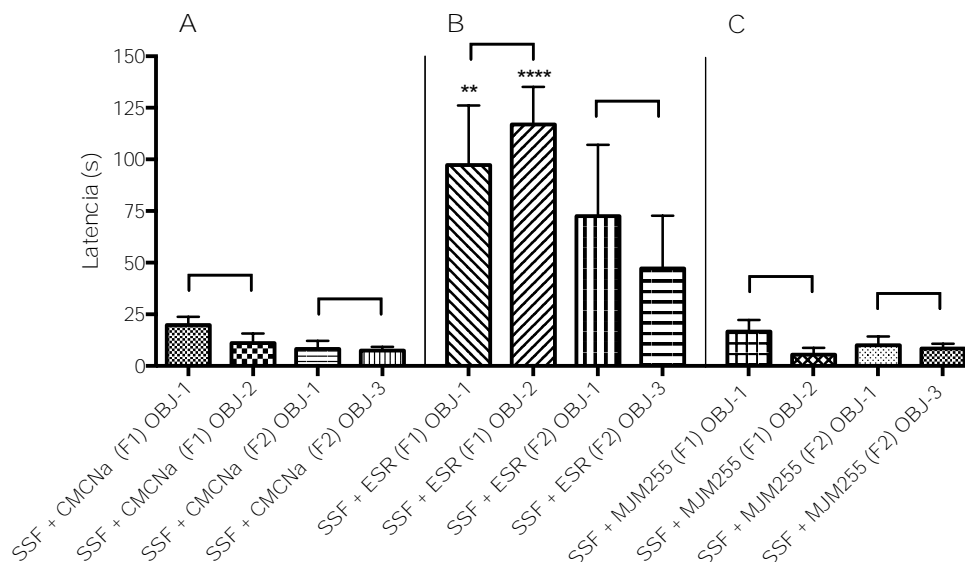
En la **Gráfica 36**, se pueden observar los resultados correspondientes al tiempo de latencia para los animales sin tratamiento previo con escopolamina, un antagonista de los receptores muscarínicos.

En la Fase 1 (F1) del experimento, no existieron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de latencia entre el primer acercamiento al OBJ-1 vs OBJ-2 en ninguno de los tres grupos de tratamiento. Tampoco en la Fase 2 (F2) del experimento existieron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de latencia entre el OBJ-1 vs OBJ-3. Para los animales, a diferencia de lo esperable, ambos objetos despertaron la misma curiosidad e impulsaron en igual medida su interés, traduciéndose en un tiempo de latencia similar entre ambos, sin importar el tratamiento recibido.

Al comparar los resultados entre los distintos grupos de tratamiento, se observó que para el grupo de animales tratados con eserina, el tiempo de latencia fue muy superior al del control, especialmente durante la F1 del experimento. El tiempo de latencia al OBJ-1 de los animales tratados con eserina aumentó de forma estadísticamente significativa ($97,13 \pm 28,86$; $P < 0,01$) respecto al grupo control ($19,80 \pm 3,90$). De igual forma, en el caso del OBJ-2 también se produjo un aumento estadísticamente significativo del tiempo de latencia en el grupo tratado con eserina ($116,9 \pm 18,21$; $P < 0,0001$) vs el grupo control ($11,10 \pm 4,58$).

Los resultados obtenidos en la F2 del experimento mostraron que, aunque el tiempo de latencia fue superior al control en el grupo tratado con eserina para los dos objetos, OBJ-1 y OBJ-3, la diferencia no resultó estadísticamente significativa para ninguno de ellos. Debe señalarse que quizá la dispersión de los resultados obtenidos, en este caso, haya hecho que las diferencias no resulten estadísticamente significativas.

Para el grupo tratado con **MJM255** los resultados fueron prácticamente idénticos a los del grupo control en ambas fases del experimento.



Gráfica 36. Tiempo de latencia en el área seleccionada para cada objeto en cada fase del experimento en ratones no tratados previamente con escopolamina tanto en la F1 (objetos iguales) como en la F2 (objetos diferentes) del experimento. ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$. (A) Control, (B) Eserina y (C) MJM255.

5.12.2. Tiempo de latencia en ratones tratados previamente con escopolamina

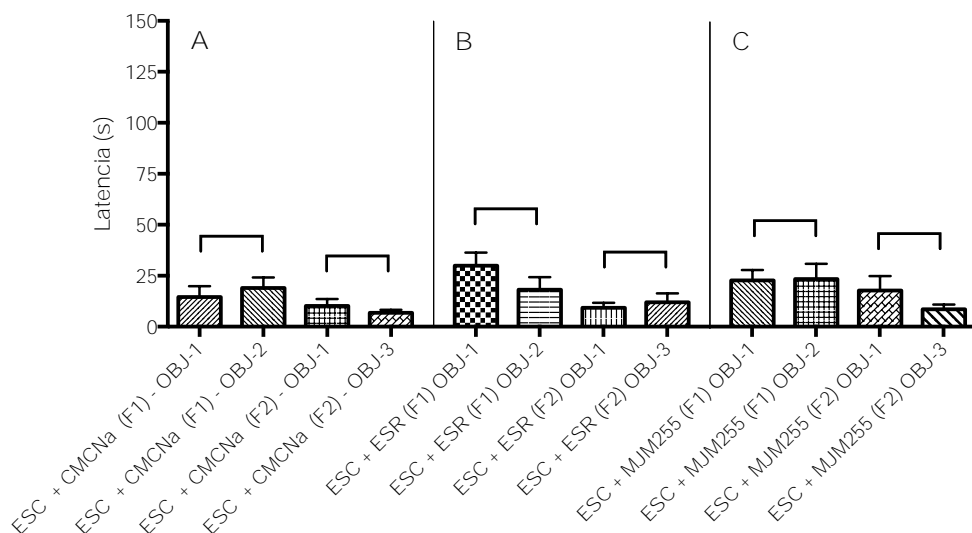
Igual que se describió previamente para los animales no tratados con escopolamina, en la **Gráfica 37** se puede observar que los animales que recibieron tratamiento previo con escopolamina, tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas ni entre el tiempo de latencia del OBJ-1 vs OBJ-2 en la F1 del experimento, ni en el tiempo de latencia del OBJ-1 vs OBJ-3 en la F2 del experimento, en ninguno de los tres grupos diferentes de tratamiento: control (**Gráfica 37 - A**), eserina (**Gráfica 37 - B**) y MJM255 (**Gráfica 37 - C**).

Sin embargo, durante la F2, en los animales tratados con el compuesto MJM255, aunque se pudo apreciar una pequeña disminución del tiempo de latencia del primer acercamiento al OBJ-3 si se compara con el del primer acercamiento al OBJ-1, esta no resultó en ningún caso estadísticamente significativa.

Al contrario de lo que ocurrió con los animales no tratados previamente con escopolamina, en los que la eserina aumentaba considerablemente y de forma estadísticamente significativa el tiempo de latencia, en este caso esa diferencia se eliminó por completo (**Gráfica 37 - B**). Esto podría corresponderse perfectamente con

el efecto antagonista de receptores muscarínicos previamente mencionado de la escopolamina, que contrarrestaría el efecto colinérgico de la eserina.

En resumen, en este caso concreto, el tiempo de latencia fue prácticamente idéntico entre objetos, fases y tratamientos.



Gráfica 37. Tiempo de latencia en el área seleccionada para cada objeto en cada fase del experimento en ratones tratados previamente con escopolamina tanto en la F1 (objetos iguales) como en la F2 (objetos diferentes) del experimento. (A) Control, (B) Eserina y (C) MJM255.

5.12.3. Frecuencia en ratones sin tratamiento previo con escopolamina

Como se muestra en la **Gráfica 38**, al comparar los resultados obtenidos en los ratones no tratados previamente con escopolamina, solo en aquellos que recibieron tratamiento con eserina se vio una disminución estadísticamente significativa entre la frecuencia de acercamiento del animal al OBJ-1 ($16,00 \pm 3,60$) y la frecuencia de acercamiento al OBJ-2 ($5,38 \pm 2,05$, $P < 0,05$) en la fase uno (F1, objetos iguales) del experimento. Sin embargo, esto no se reprodujo durante la fase dos (F2, objetos diferentes) del experimento, pues no existieron diferencias estadísticamente significativas entre el acercamiento del animal al OBJ-1 vs OBJ-3 ($20,13 \pm 5,83$ vs $16,38 \pm 6,84$) (**Gráfica 38 - B**).

Para el grupo de animales control (tratados con el vehículo) (**Gráfica 38 - A**) y para el grupo de animales tratados con el compuesto MJM255 (**Gráfica 38 - C**) no existieron diferencias en ninguna de las dos fases del experimento. En la F1 se

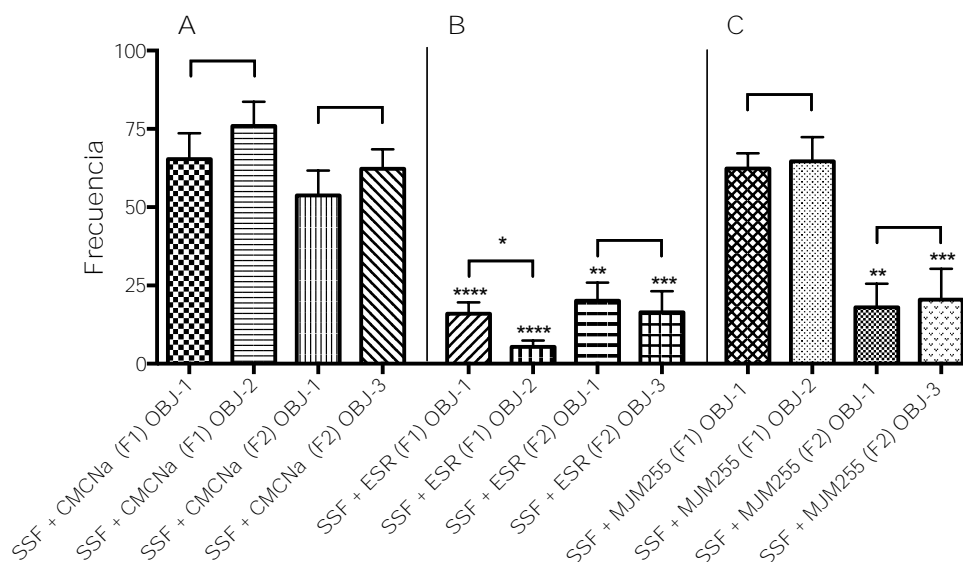
aproximaron tanto al OBJ-1 como al OBJ-2 y en la F2 se aproximaron tanto al OBJ-1 como al OBJ-3, sin existir diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de aproximación a ambos. En conclusión, los ratones no discriminaron entre los objetos.

Sin embargo, resultaron llamativos los resultados obtenidos al comparar los grupos atendiendo al tratamiento recibido, independientemente de la fase del experimento y del objeto.

En los animales tratados con eserina, la frecuencia de aproximación a los objetos fue claramente inferior a la mostrada por los animales tratados con el vehículo (control) tanto durante F1 (eserina: $16,00 \pm 3,60$; control: $65,38 \pm 8,27$; $P < 0,0001$ para el OBJ-1 y eserina: $5,38 \pm 2,05$; control: $76,00 \pm 7,70$; $P < 0,0001$ para el OBJ-2) como durante F2 (eserina: $20,13 \pm 5,83$; control: $53,75 \pm 7,98$; $P < 0,005$ para el OBJ-1 y eserina: $16,38 \pm 6,84$; control: $62,25 \pm 6,26$; $P < 0,001$ para el OBJ-3).

En los animales tratados con el compuesto **MJM255**, si bien durante la F1 del experimento no se apreciaron grandes diferencias frente al grupo control, en la F2, la frecuencia de acercamiento de los animales a los diferentes objetos fue mucho más baja (**MJM255**: $18,00 \pm 7,57$; control: $53,75 \pm 7,98$; $P < 0,01$ para el OBJ-1 y **MJM255**: $20,50 \pm 9,79$; control: $62,25 \pm 6,26$; $P < 0,01$ para el OBJ-3) y prácticamente idéntica a la del grupo de animales tratados con eserina (**Gráfica 38**).

El compuesto **MJM255**, como se ha descrito en el apartado **5.2.5.**, evidenció actividad inhibidora sobre la AChE en los ensayos *in vitro*. Por lo que una posible explicación al efecto similar al de la eserina observado en la frecuencia de aproximación a los objetos en la F2, podría ser debido a que el compuesto **MJM255** tarde más tiempo en ejercer su acción inhibidora de AChE y, por eso, los efectos aparecen con más demora si se compara con la eserina.



Gráfica 38. Frecuencia de aproximación en el área seleccionada para cada objeto en cada fase del experimento en ratones no tratados previamente con escopolamina tanto en la F1 (objetos iguales) como en la F2 (objetos distintos) del experimento. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$. (A) Control, (B) Eserina y (C) MJM255.

5.12.4. Frecuencia en ratones tratados previamente con escopolamina

En el caso de los resultados obtenidos en ratones tratados previamente con escopolamina, como se puede observar en la **Gráfica 39**, en ninguno de los grupos de tratamiento existieron diferencias estadísticamente significativas de frecuencia de acercamiento entre los diferentes objetos, es decir, OBJ-1 vs OBJ-2 ó OBJ-1 vs OBJ-3 ni durante la F1 ni durante la F2. Por tanto, los ratones no discriminaron entre los objetos en ambas fases.

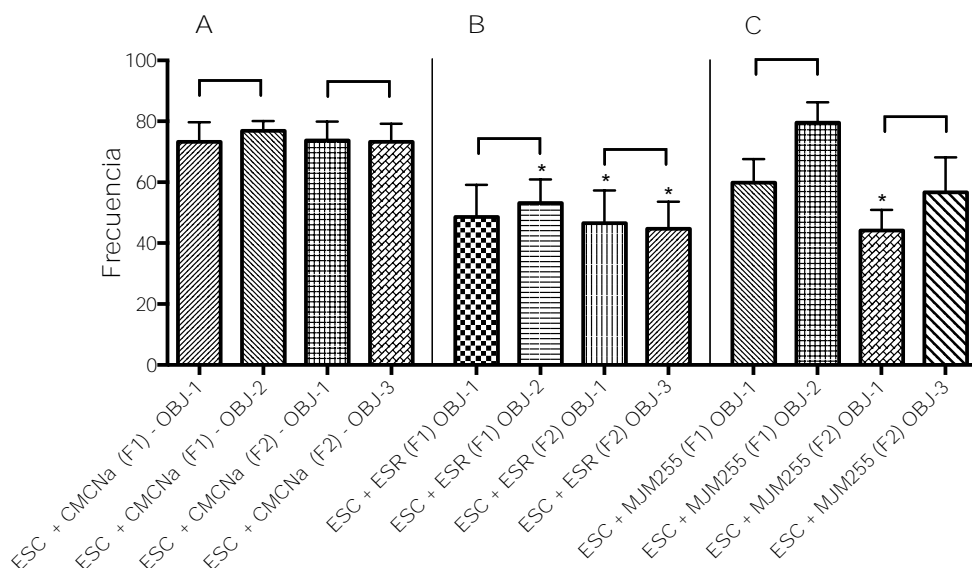
Como ya se ha mencionado, en el apartado **5.12.3**, en animales sin tratamiento previo se vio un claro descenso de la frecuencia de acercamiento a los diferentes objetos del grupo tratado con eserina, en ambas fases, frente al grupo control. Del mismo modo, este efecto también se vio en el grupo tratado con el compuesto **MJM255** frente al grupo control, pero solo en la F2 del experimento.

Este hecho, sin embargo no es tan destacable en los animales tratados previamente con escopolamina. Este resultado pondría de manifiesto un potencial efecto colinérgico central, de tipo indirecto tanto de la eserina como de nuestra molécula, ya que el mencionado descenso en la frecuencia, es anulado por un antagonista de receptores muscarínicos, la escopolamina.

Sí se apreció una disminución en la frecuencia de aproximación a los objetos de los animales tratados con eserina en ambas fases y en los animales tratados con **MJM255** en la F2 del experimento. Durante la F1 del experimento existieron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de aproximaciones al OBJ-2 en los animales tratados con eserina frente al grupo control (eserina: $53,14 \pm 7,77$; control: $76,86 \pm 3,27$; $P < 0,05$). Para el OBJ-1 se puede señalar una tendencia a disminuir la frecuencia de acercamiento en los animales tratados con eserina pero estas diferencias no son estadísticamente significativas.

Del mismo modo, al analizar la F2 del experimento, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de acercamiento al OBJ-1 tanto en el caso de eserina ($46,57 \pm 10,75$; $P < 0,05$) como de **MJM255** ($44,14 \pm 6,78$; $P < 0,01$) frente al grupo control ($73,71 \pm 6,19$). Además, los resultados de eserina y **MJM255** fueron muy similares entre sí. En el caso del OBJ-3, estas diferencias frente al grupo control sólo se observaron en los animales tratados con eserina ($44,71 \pm 8,87$; control: $73,29 \pm 5,89$; $P < 0,05$). En el caso del **MJM255**, se observó una tendencia a disminuir la frecuencia de acercamiento al OBJ-3, si bien esta no resultó estadísticamente significativa.

Los valores de frecuencia del grupo tratado con el compuesto **MJM255** en la F2 del experimento volvieron a ser muy similares a los valores de frecuencia del grupo tratado con eserina en las dos fases del experimento, reforzando la idea de que ambos tienen mecanismos similares pero que el compuesto **MJM255** tarda más en manifestar su efecto.



Gráfica 39. Frecuencia de aproximación en el área seleccionada para cada objeto en cada fase del experimento en ratones tratados previamente con escopolamina tanto en la F1 (objetos iguales) como en la F2 (objetos diferentes) del experimento. * $P < 0,05$. (A) Control, (B) Eserina y (C) MJM255.

5.12.5. Tiempo en zona en ratones sin tratamiento previo con escopolamina

Como se muestra en la **Gráfica 40**, al comparar los resultados obtenidos en los ratones que no recibieron escopolamina, en ninguno de los grupos de tratamiento existieron diferencias estadísticamente significativas para el tiempo de permanencia en zona entre los diferentes objetos (OBJ-1 vs OBJ-2 ó OBJ-1 vs OBJ-3) ni durante la F1 ni durante la F2.

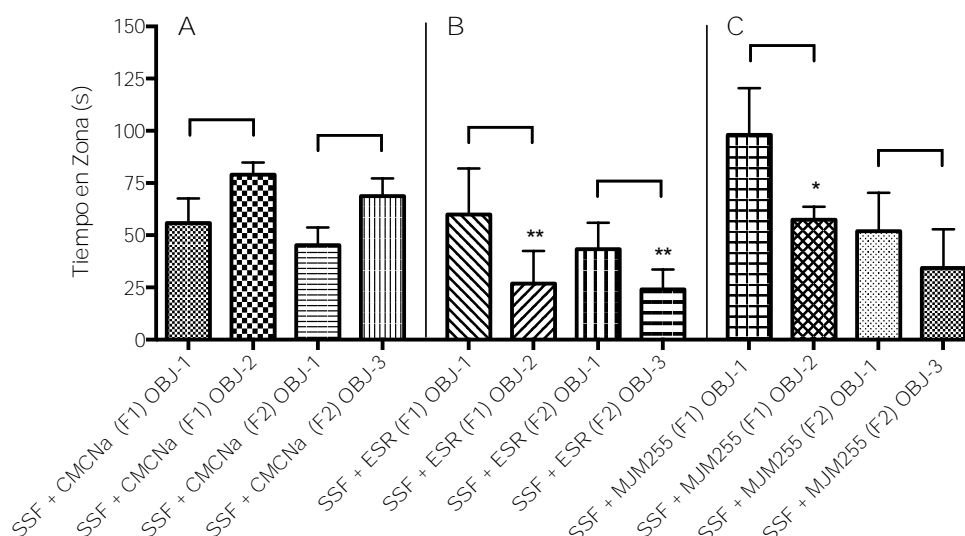
Para el grupo de ratones tratados con el compuesto **MJM255**, parece existir una tendencia a aumentar el tiempo de permanencia en la zona del OBJ-1 durante la F1 del experimento cuando se compara frente al OBJ-2, pero esta no es estadísticamente significativa (**Gráfica 40**).

Si analizamos los resultados obtenidos según los diferentes tratamientos durante la F1 del experimento, podemos afirmar que los ratones tratados con el compuesto **MJM255** mostraron una tendencia a aumentar el tiempo en zona en el OBJ-1 respecto al grupo control, si bien estos resultados no son estadísticamente significativos.

También durante F1, se apreció una disminución estadísticamente significativa para el tiempo en la zona del OBJ-2, tanto para el grupo tratado con eserina ($26,83 \pm 15,72$;

$P<0,005$) como para el tratado con **MJM255** ($57,40 \pm 6,26$; $P<0,05$) respecto al grupo control ($78,98 \pm 5,92$).

Al analizar la F2 del experimento, se observó que, la eserina ($24,11 \pm 9,53$; $P<0,005$) disminuye de forma estadísticamente significativa el tiempo en zona del OBJ-3 respecto al grupo control ($68,73 \pm 8,45$); sin embargo esto no se reprodujo en el grupo tratado con **MJM255**.



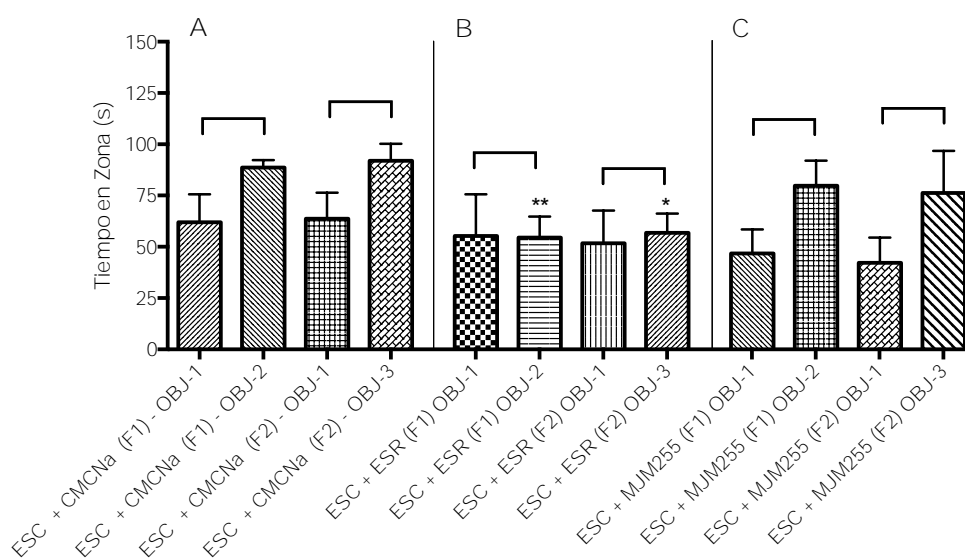
Gráfica 40. Tiempo de permanencia en zona en el área seleccionada para cada objeto en cada fase del experimento en ratones no tratados previamente con escopolamina tanto en la F1 (objetos iguales) como en la F2 (objetos diferentes) del experimento. * $P<0,05$, ** $P<0,01$. (A) Control, (B) Eserina y (C) **MJM255**.

5.12.6. Tiempo en zona en ratones tratados previamente con escopolamina

Como se puede observar en la **Gráfica 41**, al analizar los resultados obtenidos en los ratones tratados previamente con escopolamina, no existieron diferencias estadísticamente significativas ni entre el tiempo en zona de OBJ-1 vs OBJ-2 durante la F1 del experimento, ni entre el tiempo en zona de OBJ-1 vs OBJ-3 durante la F2 para los distintos grupos de tratamiento: control (**Gráfica 41 – A**), eserina (**Gráfica 41 – B**) y **MJM255** (**Gráfica 41 – C**).

Para los grupos control y tratado con **MJM255**, se pudo observar una ligera tendencia a disminuir la permanencia en la zona del OBJ-1 en ambas fases, si bien la diferencia no resultó, en ningún caso, estadísticamente significativa.

Si analizamos los resultados obtenidos según los diferentes tratamientos, podemos observar que únicamente el tratamiento con eserina permitió observar diferencias estadísticamente significativas en ambas fases del experimento frente al grupo control. En la F1, el tiempo en la zona del OBJ-2 de los animales tratados con eserina ($54,43 \pm 10,25$; $P < 0,01$) disminuyó respecto al del grupo control ($88,66 \pm 3,64$). Durante F2 se observaron resultados similares, el tiempo en la zona del OBJ-3 disminuyó de forma estadísticamente significativa para el grupo tratado con eserina ($56,77 \pm 9,45$; $**P < 0,01$) respecto al grupo control ($91,91 \pm 8,31$).



Gráfica 41 Tiempo de permanencia en zona en el área seleccionada para cada objeto en cada fase del experimento en ratones tratados previamente con escopolamina tanto en la F1 (objetos iguales) como en la F2 (objetos diferentes) del experimento. $*P < 0,05$, $**P < 0,01$. (A) Control, (B) Eserina y (C) MJM255.

Pese a la variabilidad observada en los resultados, existen evidencias que inducen a pensar que el compuesto **MJM255** podría inhibir la AChE en ratones, aumentando los niveles del neurotransmisor ACh a nivel cerebral.

En resumen, son especialmente relevantes los resultados que se aportan en la **Gráfica 38**, pues en ella se puede observar claramente que el **MJM255** modifica la frecuencia con la que los animales se acercan a los objetos durante la F2 del experimento, reduciéndola y mostrando un efecto similar al de la eserina, si bien este efecto tarda más tiempo en aparecer.

Debido a ello, el compuesto **MJM255** representa una molécula prometedora al presentar unas actividades interesantes que deberán abordarse de forma más pormenorizada en estudios posteriores.



5.13. ESTUDIO *IN VIVO*: BIODISPONIBILIDAD

Los estudios de biodisponibilidad se han llevado a cabo con los cinco derivados de cumarina seleccionados para la realización de estudios *in vivo* considerando su actividad *in vitro* como inhibidores de la MAO-B y de la AChE.

Los compuestos fueron **CUM21**, con estructura de 3-fenilcumarina; **MC151** con estructura de 3-(piridazin-3-il)cumarina; **MJM255**, con estructura de 3-benzamidocumarina; **MJM470**, con estructura de 3-(tiofen-2-il)cumarina y **MJM272**, con estructura de 7-benzamido-4-metilcumarina.

5.13.1. Identificación de los patrones

Para la identificación de los patrones de los derivados de cumarina seleccionados se utilizó una solución de metanol:agua (80:20). El barrido de longitudes de onda de absorbancia para cada uno de los compuestos permitió conocer el punto máximo de absorbancia de los mismos, que será la longitud de onda analítica utilizada: **CUM21** λ 340 nm; **MC151** λ 205 nm; **MJM255** λ 280 nm; **MJM470** λ 380 nm y **MJM272** λ 340 nm. Estos valores se mostraron previamente en la sección material y métodos, en la **Tabla 16**.

Para su detección mediante cromatografía líquida de alta eficacia, se obtuvieron los correspondientes cromatogramas a partir de los que se determinaron los tiempos de retención de cada uno de los compuestos: **CUM21** 14,6 minutos; **MC151** 18 minutos; **MJM255** 17,07 minutos; **MJM470** 17,4 minutos y **MJM272** 13,85 minutos. Estos valores se mostraron previamente en la sección material y métodos, en la **Tabla 17**.

Se prepararon muestras de los derivados cumarínicos seleccionados a distintas concentraciones para utilizar como patrones de referencia. Como ejemplo ilustrativo de identificación de un patrón, en la **Figura 70** se muestra la detección por HPLC del compuesto **MJM470** a diferentes concentraciones.

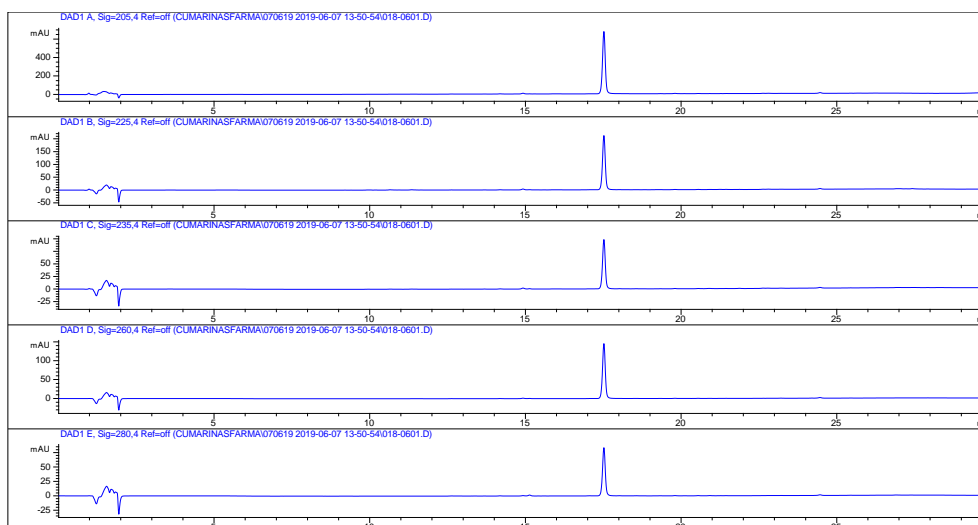


Figura 70. Identificación del patrón **MJM470** a distintas concentraciones. Tiempo de retención 14,7 min. λ 380 nm.

Una vez identificados todos los derivados de cumarina seleccionados, se procedió al análisis de las muestras por HPLC para obtener los correspondientes cromatogramas.

5.13.2. Cromatogramas

En las muestras obtenidas de animales que recibieron el compuesto derivado de 3-fenilcumarina **CUM21** por vía intraperitoneal, se detectó la presencia del mismo a la media hora y a la hora siguientes a su administración. Las tomas recogidas a las 3, 6 y 24 horas de la administración i.p. del compuestos no evidenciaron presencia del mismo. Pese a haber logrado identificarlo no fue posible llevar a cabo su cuantificación, ya que la concentración en plasma del compuesto **CUM21** estuvo por debajo del límite de cuantificación del método de HPLC desarrollado en todas las muestras.

En las muestras obtenidas de plasma de los animales que recibieron el compuesto **CUM21** por vía oral, este no se detectó a ninguno de los tiempos estudiados.

La **Figura 71** recoge los cromatogramas correspondientes al patrón de referencia del compuesto **CUM21** a 10 ppm (**A**) y 1 ppm (**B**) y a dos de las muestras de plasma recogidas a la media hora de que los animales recibieran el compuesto tras una administración i.p. (**C**) o una administración p.o. (**D**).

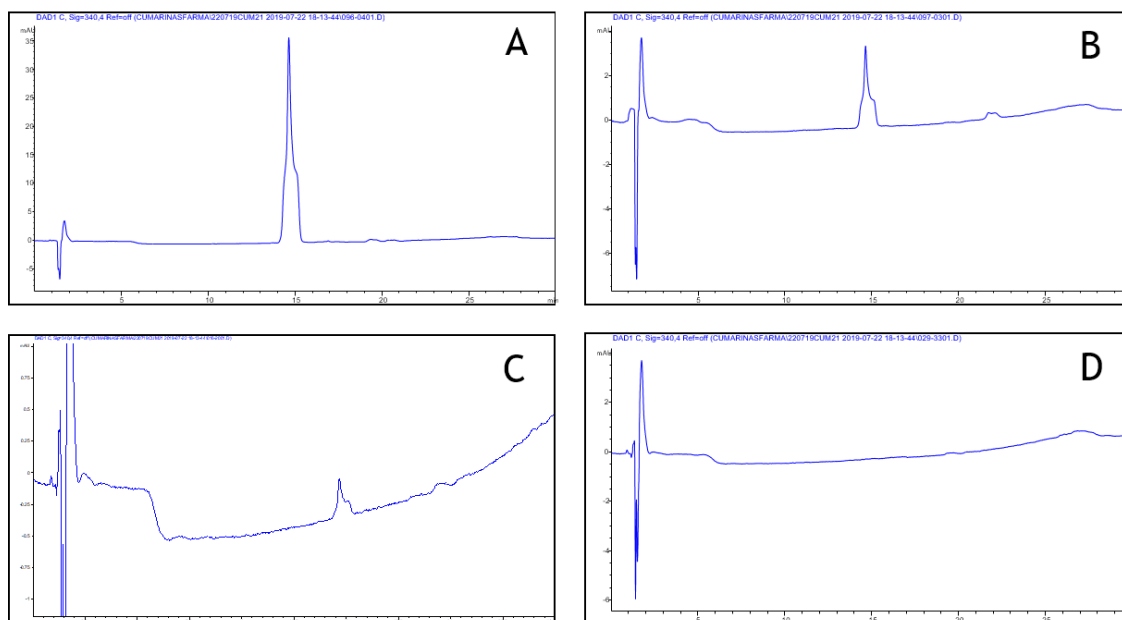


Figura 71. Cromatogramas para el compuesto **CUM21**. (A) Patrón de referencia a 10 ppm, (B) patrón de referencia a 1 ppm, (C) muestra obtenida a $t_{1/2}$ de plasma tras la administración i.p. y (D) muestra obtenida a $t_{1/2}$ de plasma tras la administración p.o.

Los derivados de cumarina **MC151**, **MJM255**, **MJM470** y **MJM272** no se detectaron en las muestras de plasma analizadas a ninguno de los tiempos estudiados ni en los casos en los que la administración se llevó a cabo por vía intraperitoneal ni en los que se administraron por vía oral. A continuación se muestran los cromatogramas representativos de muestras de plasma de animales que recibieron cada uno de los derivados de cumarina indicados por las dos vías de administración estudiadas.

La **Figura 72** recoge los cromatogramas correspondientes al patrón de referencia del compuesto **MJM470** a 1 ppm (**A**) y 1 ppm (**B**) y a dos de las muestras de plasma recogidas a la media hora de que los animales recibieran el compuesto tras una administración i.p. (**C**) o una administración p.o. (**D**).

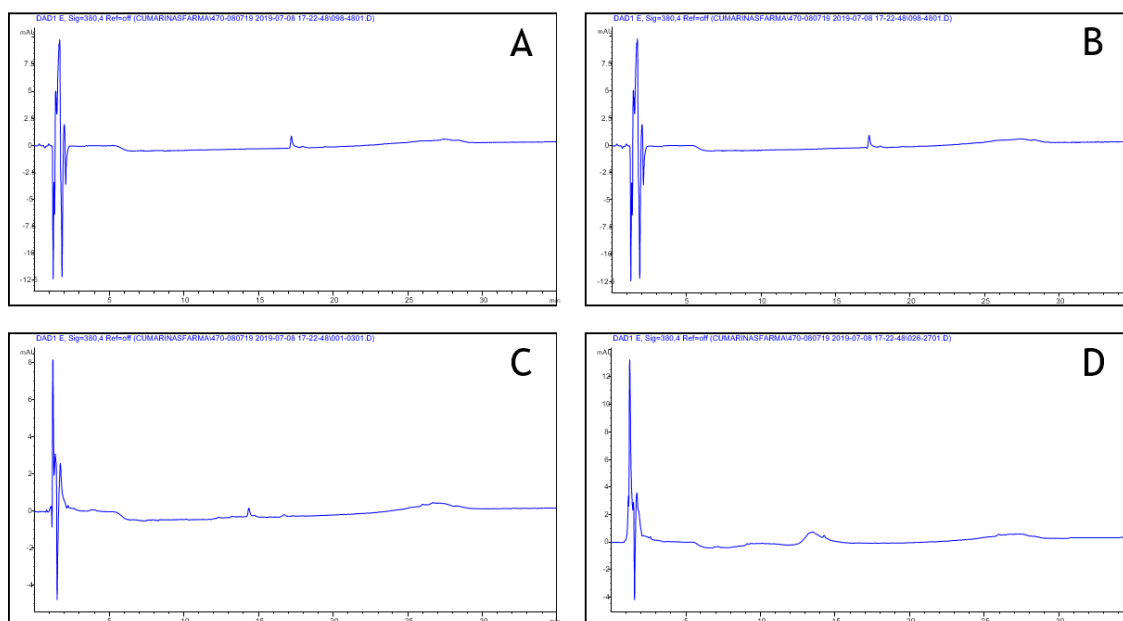


Figura 72. Cromatogramas para el compuesto **MJM470**. (A) Patrón de referencia a 1 ppm, (B) Patrón de referencia a 1 ppm, (C) muestra obtenida a $t_{1/2}$ de plasma tras la administración i.p. (no se detecta) y (D) muestra obtenida a $t_{1/2}$ de plasma tras la administración p.o. (no se detecta).

La **Figura 73** recoge los cromatogramas correspondientes al patrón de referencia del compuesto **MC151** a 10 ppm (A) y 1 ppm (B) y a dos de las muestras de plasma recogidas a la media hora de que los animales recibieran el compuesto tras una administración i.p. (C) o una administración p.o. (D).

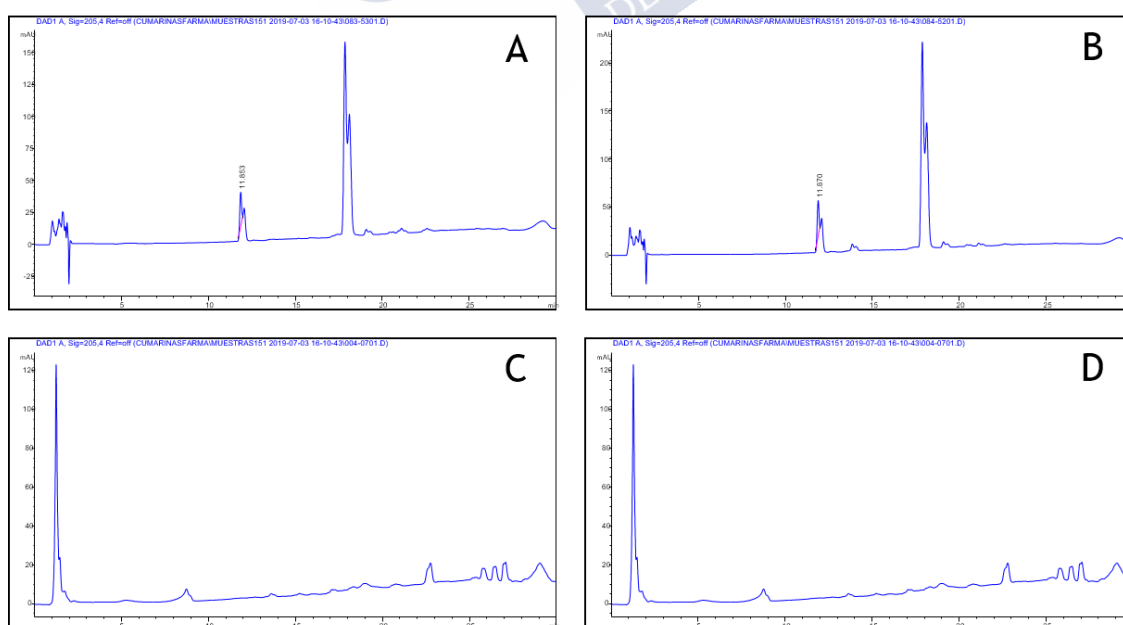


Figura 73. Cromatogramas para el compuesto **MC151**. (A) Patrón de referencia a 10 ppm, (B) Patrón de referencia a 1 ppm, (C) muestra obtenida a $t_{1/2}$ de plasma tras la administración i.p. (no se detecta) y (D) muestra obtenida a $t_{1/2}$ de plasma tras la administración p.o. (no se detecta).

Como puede apreciarse en la **Figura 73 (A) y (B)**, para el compuesto **MC151** se encontraron dos picos en lugar de uno. Esto podría deberse a impurezas presentes en el compuesto o a algún tipo de producto de degradación que pudiera formarse por la alteración del compuesto.

La **Figura 74** recoge los cromatogramas correspondientes al patrón de referencia del compuesto **MJM272** a 10 ppm (**A**) y 1 ppm (**B**) y a dos de las muestras de plasma recogidas a la media hora de que los animales recibieran el compuesto tras una administración i.p. (**C**) o una administración p.o. (**D**).

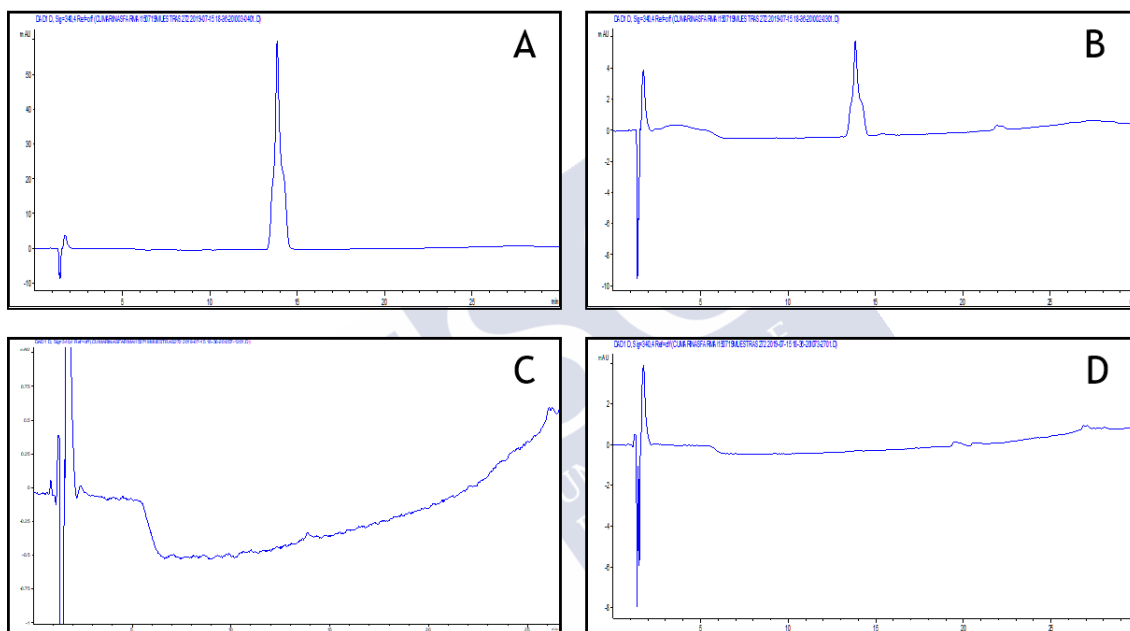


Figura 74. Cromatogramas para el compuesto **MJM272**. (**A**) Patrón de referencia a 10 ppm, (**B**) Patrón de referencia a 1 ppm, (**C**) muestra obtenida a $t_{1/2}$ de plasma tras la administración i.p. (no se detecta) y (**D**) muestra obtenida a $t_{1/2}$ de plasma tras la administración p.o. (no se detecta).

La **Figura 75** recoge los cromatogramas correspondientes al patrón de referencia del compuesto **MJM255** a 10 ppm (**A**) y 1 ppm (**B**) y a dos de las muestras de plasma recogidas a la media hora de que los animales recibieran el compuesto tras una administración i.p. (**C**) o una administración p.o. (**D**).

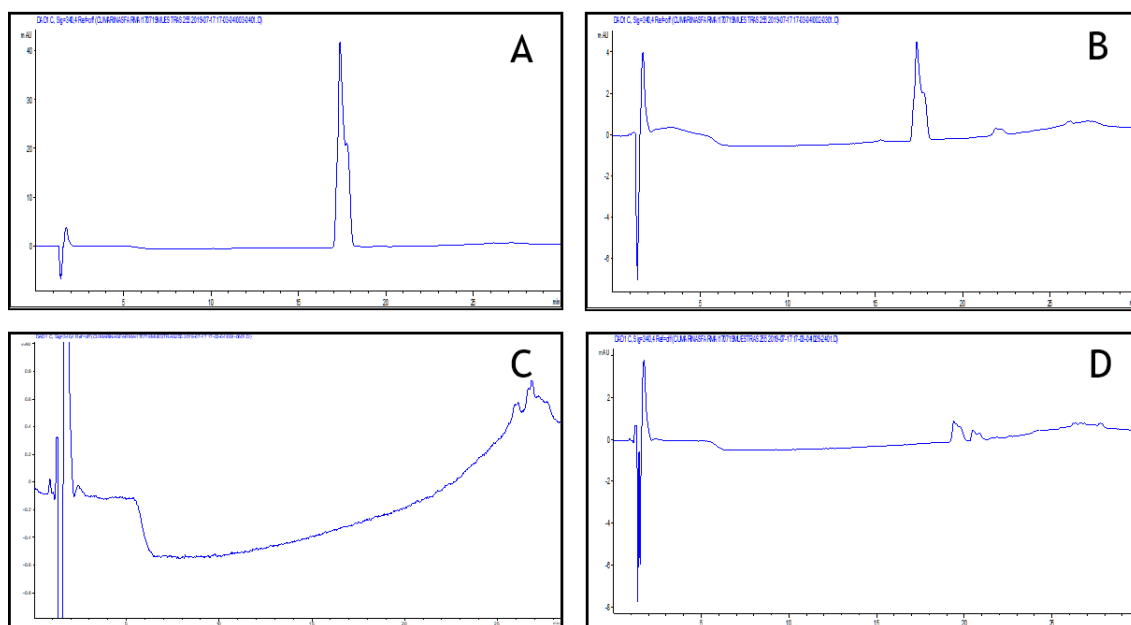


Figura 75. Cromatogramas para el compuesto **MJM255**. (A) Patrón de referencia a 10 ppm, (B) Patrón de referencia a 1 ppm, (C) muestra obtenida a $t_{1/2}$ de plasma tras la administración i.p. (no se detecta) y (D) muestra obtenida a $t_{1/2}$ de plasma tras la administración p.o. (no se detecta).





DISCUSIÓN



6. DISCUSIÓN

Este trabajo de investigación ha tenido como objetivo general identificar, a través de un cribado farmacológico, nuevos derivados de cumarina con potencial interés en el tratamiento de las dos enfermedades neurodegenerativas con mayor prevalencia en la población actual: la EP y la EA.

En la revisión bibliográfica se ha dejado constancia de que el núcleo de cumarina constituye un *scaffold* adecuado para la obtención de nuevas moléculas con interesantes propiedades farmacológicas relacionadas con la fisiopatología de estas enfermedades.

Para realizar el cribado se han seleccionado varias dianas relevantes en la terapéutica actual: las MAO, las ChE y la BACE1. Aunque actualmente no existe ningún inhibidor de BACE1 comercializado, la hipótesis de A β para explicar el origen de la EA, confiere un gran interés a los fármacos que actúen sobre esta enzima para evitar la progresión de la enfermedad. Además, con el objetivo de identificar moléculas multidiana y atendiendo a la necesidad de que estas no solo actúen sobre la sintomatología de estas enfermedades, sino también sobre los procesos subyacentes que conducen a la neurodegeneración, se ha evaluado la posible actividad neuroprotectora de los nuevos derivados de cumarina, tratando de determinar los mecanismos implicados en la misma.

Conscientes de la necesidad de que estas moléculas sean capaces de acceder al SNC para ejercer su acción, se ha llevado a cabo el cálculo de sus propiedades físico-químicas y la predicción teórica de su paso a través de la BHE. Además se ha estudiado su posible actividad neurotóxica como paso previo a la posterior realización de estudios *in vivo*. Entre las series estudiadas, los derivados curcumina-cumarina son moléculas de gran tamaño que no presentan unas propiedades físico-químicas adecuadas para permitir su paso a través de las membranas celulares, por lo que se ha estudiado su actividad neuroprotectora formuladas en nanopartículas para favorecer su penetración en las células.

Por último para los derivados que han presentado mayor actividad frente a la MAO-B y la AChE, se han llevado a cabo estudios *in vivo* de biodisponibilidad y comportamiento en modelos experimentales de EP y EA.

6.1. DERIVADOS DE CUMARINA CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE MAO

Hay varias razones que justifican el potencial terapéutico de los inhibidores de la MAO-B en la EP o incluso en la EA, como por ejemplo el aumento de la actividad de la MAO-B en el cerebro humano con el envejecimiento, y específicamente en personas que sufren EP o EA¹¹, dando lugar a una alteración en los niveles de neurotransmisores junto con un exceso de radicales libres tóxicos, que causan daño mitocondrial que resulta en muerte neuronal. Además, una serie de modelos experimentales de la EP han demostrado los efectos neuroprotectores de la inhibición de la MAO-B^{414,415} y existe una opinión general de que otros mecanismos celulares no relacionados con la degradación de neurotransmisores estarían involucrados en las propiedades neuroprotectoras de estos fármacos⁴¹⁶.

En esta memoria se describe la actividad inhibidora sobre las isoformas de la MAO de cumarinas sustituidas en posiciones que anteriormente se habían revelado adecuadas para obtener IMAOs²³⁶. La sustitución en posición 3 de la cumarina con un anillo de fenilo origina análogos híbridos resveratrol-cumarina. Este tipo de derivados sustituidos en las posiciones 6 y/o 8 de la cumarina con grupos alquilo, alcoxi o halógeno habían sido ya descritos por nuestro grupo como inhibidores potentes y selectivos de la MAO-B^{236-239,417}. Nuestros resultados revelan que la introducción de un sustituyente metoxilo en posición 7 del núcleo de cumarina (**CUM9** y **CUM10**) origina igualmente inhibidores potentes y selectivos de la MAO-B, con actividad en el rango nanomolar, mientras que los sustituyentes hidroxilo en estas posiciones conducen a una pérdida de potencia y selectividad, dando lugar a derivados con actividad en el rango micromolar. Además es destacable que el incremento en el número de grupos hidroxilo tanto sobre el núcleo de cumarina como sobre el sustituyente fenilo (**CUM51**, **JLG5b**, **JLG12b**) incrementa la actividad inhibidora de la MAO-A a la vez que, de forma general, decrece la actividad inhibidora de la MAO-B, lo que conduce a una pérdida de selectividad. En general, los análogos híbridos resveratrol-cumarina estudiados

correspondientes a la serie de 3-fenilcumarinas resultan ser IMAO-B entre 1,5 y 171 veces más potentes que el *trans*-RESV.

La sustitución isostérica del fenilo de la posición 3 de la cumarina por un heteroarilo condujo a los derivados de 3-heteroarilcumarina que pueden ser también considerados análogos híbridos resveratrol-cumarina, aun cuando estos derivados no presentan ya el fragmento de *trans*-estilbeno correspondiente al *trans*-RESV. Nuestro grupo había descrito previamente 3-tiofenil y 3-imidazolilcumarinas con actividad inhibidora de MAO-B, resultando más potentes aquellas que presentaban además un grupo metoxilo en posición 6 del núcleo de cumarina⁴¹⁸. En esta memoria se describe la actividad inhibidora de la MAO de derivados de 3-(tiofen-2-il)cumarina sustituidos en posiciones 7 y/o 8 de la cumarina con grupos hidroxilo, observándose que la posición de los sustituyentes es determinante para la selectividad. La 8-hidroxi-3-(tiofen-2-il)cumarina (**MJM450**) es un inhibidor selectivo de la isoforma A, mientras la sustitución tanto en posición 7 como simultáneamente en 7 y 8, conduce a una pérdida de selectividad. La introducción de un átomo de bromo en posición 4 del anillo de tiofeno de la 7-hidroxi-3-(tiofen-2-il)cumarina origina el inhibidor MAO-B más potente de la serie (**MJM470**), con mayor actividad que las 3-tiofenilcumarinas previamente descritas⁴¹⁸.

De igual forma, se analiza el efecto de la sustitución bioisostérica benzeno/piridazina sobre la afinidad y selectividad hacia la MAO-B. Como se podía predecir a partir de los resultados previamente descritos, la sustitución con grupos metilo o metoxilo en posiciones 6 ó 7 del núcleo de cumarina y un átomo de bromo en posición 6 del anillo de piridazina origina derivados de 3-piridazinilcumarina con actividad en el rango micromolar (**MC144** y **MC147**) o submicromolar (**MC145** y **MC146**). Reproduciendo las sustituciones realizadas sobre el núcleo de cumarina en los derivados de 3-fenilcumarina^{238,419} analizamos también la actividad de 3-(6-halógenopiridazinil)cumarinas que incorporan un halógeno (Cl o Br) sobre el núcleo de cumarina resultando que la presencia de un átomo de bromo en posición 8 (**MC152** y **MC154**) pero más aún en posición 7 (**MC151** y **MC156**) incrementa la actividad inhibidora y la selectividad sobre la isoforma B de la MAO, obteniéndose derivados con actividad en el rango de concentración del R-(-)-deprenilo o selegilina, utilizado como fármaco de referencia. **MC151**, el derivado más potente de esta serie, es

aproximadamente 500 veces más potente y más selectivo que el *trans*-RESV como IMAO-B.

En general, los análogos híbridos resveratrol-cumarina convenientemente sustituidos que han sido descritos en esta memoria mejoran la actividad inhibidora y la selectividad sobre la isoforma B de la MAO con respecto al *trans*-RESV.

La introducción de un puente amido entre el fenilo de la posición 3 y la cumarina origina los derivados de 3-benzamidocumarina. Este tipo de sustitución busca potenciar la actividad inhibidora de colinesterasas, como se comentará posteriormente, pero el estudio de su actividad inhibidora de la MAO pone de manifiesto un perfil dual IMAO-B/ICChE para algunos derivados de esta serie. Los sustituyentes presentes en el grupo benzamido habían sido ya estudiados para los derivados de 3-fenilcumarina, originando derivados potentes y selectivos sobre la MAO-B. Nuestros resultados indican que la introducción del puente amido conduce a una importante pérdida de la actividad sobre la MAO-B; por ejemplo **MJM324** resultó 10 veces menos potente que la 6-metil-3-(4'-metilfenil)cumarina previamente descrita por nuestro grupo⁴¹⁷. Además, contrariamente a lo que se había observado para los derivados de 3-fenilcumarina, la sustitución sobre el anillo bencénico, en general, también disminuye esta actividad. De esta forma, la 3-benzamidocumarina (**MJM246**) aparece como el inhibidor MAO-B más interesante entre los derivados que no presentan ningún sustituyente en el anillo bencénico de la cumarina. Estos derivados presentan actividad en el rango micromolar o submicromolar y son selectivos sobre la isoforma MAO-B. La presencia de un grupo hidroxilo en la posición 4 de la cumarina no resulta adecuada para la actividad inhibidora de la MAO, como ya se había observado para los derivados de 3-fenil-4-hidroxycumarina, inhibidores de MAO-B menos potentes que los correspondientes derivados de 3-fenilcumarina⁴²⁰.

De forma similar a las modificaciones estructurales estudiadas sobre los análogos híbridos resveratrol-cumarina, se evaluaron una serie de isómeros en los que el anillo bencénico fue sustituido por un heteroarilo como tiofeno, piridina o furano. Esta sustitución isostérica conduce a una pérdida mayor de la actividad inhibidora de la MAO-B, similar a lo que se ha descrito para los análogos híbridos resveratrol-cumarina. Se evaluaron además cumarinas con un sustituyente amido (benzamido, heteroarilamido

o alquilamido) en posición 7 y un grupo metilo en posición 4, ambas posiciones han sido descritas por nosotros y otros autores como adecuadas para la sustitución para obtener cumarinas con actividad inhibidora de MAO-B²³⁴. Los resultados obtenidos muestran que en general, los derivados de 7-benzamido y 7-heteroarilamidocumarina son inhibidores más potentes de la isoforma B de la MAO que los derivados de 3-amidocumarina, presentando además selectividad sobre esta isoforma. Para los derivados de 7-alquilamidocumarina, los mejores resultados como IMAO-B corresponden a aquellos con sustituyentes voluminosos mientras que si estos son de pequeño tamaño, carecen de selectividad.

Dadas las interesantes propiedades descritas para la curcumina en relación con la EA y la EP³⁸²⁻³⁹⁶, se ha evaluado también una serie de análogos híbridos curcumina-cumarina que presentan la sustitución bioisostérica de uno o ambos anillos bencénicos de la curcumina por un núcleo de cumarina que se une a la cadena alquénica a través de la posición 3 ó 4 de la cumarina. A la vista de los resultados obtenidos, los análogos curcumina-cumarina evaluados son inhibidores de la MAO-B menos potentes y selectivos que la curcumina. Sin embargo, **A1K** y **A1L** resultaron aproximadamente 2 y 4 veces, respectivamente, más potentes sobre la MAO-A que la curcumina. Puesto que los inhibidores de la MAO-A son utilizados para el tratamiento de la depresión⁴²¹, los resultados obtenidos abren una nueva perspectiva sobre el interés farmacológico de este tipo de derivados de cumarina.

Los derivados de cumarina evaluados inhiben reversiblemente la isoforma B de la MAO. Los dos inhibidores de la MAO-B que se utilizan en el tratamiento de la EP desde hace muchos años, selegilina y rasagilina, inhiben la enzima de forma irreversible al unirse a su centro activo a través de un enlace covalente entre el fragmento de N-propargil y el FAD. Como ya se ha comentado, proporcionan un efecto sintomático a través del aumento de los niveles de DA y su acción sobre los síntomas motores en pacientes con EP pero, se ha demostrado que, además, disminuyen la progresión de la muerte neuronal en modelos experimentales de la EP. Por lo tanto, durante años, los esfuerzos para obtener nuevos inhibidores se centraron principalmente en el diseño y síntesis de inhibidores irreversibles. Sin embargo, la safinamida, un IMAO-B reversible aprobado por la FDA hace pocos años, demostró un buen perfil farmacológico y menos efectos secundarios^{11,422}.

Los inhibidores irreversibles presentan curvas de fusión de proteínas bifásicas, gran unión entálpicamente favorable y entrópicamente desfavorable, en contraste con los inhibidores reversibles, que se caracterizan por un aumento dependiente de la dosis en la estabilidad térmica y la unión impulsada por la entalpía. Debido a ello, muchos autores consideran que los inhibidores de la MAO-B de próxima generación serán inhibidores reversibles, como lazabemida, EVT-302 y HT-3951⁴²³ lo que confiere a nuestros derivados de cumarina un potencial adicional para su desarrollo farmacológico.

6.2. DERIVADOS DE CUMARINA CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE ChE

Como ya se ha comentado en esta memoria, existen cuatro inhibidores de AChE comercializados para el tratamiento de la EA que son, junto con la memantina, los únicos fármacos que han demostrado ser eficaces para retrasar la progresión de la enfermedad^{171,172}. Los estudios desarrollados en las últimas décadas indican que en los cerebros de pacientes con EA, la AChE, además de catalizar la hidrólisis de la acetilcolina, también juega un papel importante en el depósito de placas A β debido a su interacción con el péptido A β a través de un conjunto de aminoácidos localizados cerca del PAS de la enzima⁴²⁴, demostrando que los IACHe que se unen al PAS podrían inhibir este proceso⁴²⁵. Más recientemente se ha descrito también la implicación del sistema colinérgico neuronal y no neuronal en la modulación del flujo sanguíneo regional cerebral, lo que contribuye a incrementar el interés por el potencial de las terapias colinérgicas en la EA⁴²⁶. Los niveles de ACh están también regulados por la BuChE, otra enzima ChE con un papel sináptico de hidrólisis de ACh menos importante que la AChE en cerebros sanos. Sin embargo, se ha descrito que en la EA la actividad de la AChE permanece sin cambios o incluso disminuye mientras que la actividad de la BuChE aumenta progresivamente, lo que sugiere que la inhibición de la BuChE también puede considerarse un enfoque válido para la terapia de la EA¹⁶⁹. El papel de la BuChE en la regulación de la transmisión colinérgica aún no se comprende completamente y la AChE sigue siendo el objetivo principal. Sin embargo, este nuevo escenario ha alentado la búsqueda de fármacos que inhiban las enzimas ChE, AChE y BuChE.

En la revisión bibliográfica de la presente memoria se describen un gran número de cumarinas con actividad inhibidora de ChE, destacando la presencia de sustituyentes

voluminosos en posiciones 3 ó 7 del núcleo de cumarina como adecuada para obtener derivados que presenten esta actividad²⁴¹⁻²⁴⁶.

La bibliografía también recoge derivados de 3-fenilcumarina con un grupo amino secundario sobre el fenilo de la posición 3 ó en la posición 7 del núcleo de cumarina, que presentan actividad inhibidora de AChE y BuChE, en ellos se observa además que la presencia de sustituyentes voluminosos en estas posiciones incrementa la actividad inhibidora de AChE^{427,428}. Nuestros resultados indican que en la serie de 3-fenilcumarinas evaluada, los mejores resultados de actividad corresponden a aquellos derivados que no presentan sustituyentes sobre el fenilo de la posición 3 (**CUMIa** y **JLG9b**). Estos derivados inhiben selectivamente la BuChE en el rango micromolar. Ambos presentan un grupo hidroxilo en posición 7, un rasgo estructural que comparten con la escopoletina²⁴¹. Por otro lado, en las series de 3-heteroarilcumarinas evaluadas, únicamente la 7-hidroxi-3-(tiofen-2-il)cumarina (**MJM451**) presenta una actividad destacable inhibiendo la BuChE a concentración micromolar. En resumen, de los resultados obtenidos para los diferentes análogos híbridos resveratrol-cumarina podemos inferir que la posición 7 de la cumarina es la más adecuada para la sustitución, lo que concuerda con los datos de la bibliografía, un sustituyente adicional en el núcleo de cumarina reduce la actividad de los derivados de 7-hidroxi-3-fenilcumarina o 7-hidroxi-3-heteroarilcumarina y lo mismo ocurre con los sustituyentes sobre el fenilo o heteroarilo de la posición 3. Los análogos híbridos resveratrol-cumarina representan, por tanto, un *scaffold* adecuado para farmacomodulación permitiendo obtener inhibidores de AChE^{427,428} o BuChE en función de los sustituyentes presentes en la molécula.

En relación con los derivados de 3-benzamidocumarina, en la revisión bibliográfica se recogen 3-amidocumarinas con mayor actividad sobre AChE que sobre BuChE²⁴⁵. Se han descrito también 3-(4-piperazin-1-carbonil)cumarinas con actividad inhibidora de AChE en el rango de concentración micromolar⁴²⁹. Nuestros resultados nos permiten observar que para que los derivados de 3-benzamidocumarina presenten actividad inhibidora de AChE es necesario un sustituyente en la posición 4 del anillo bencénico (**MJM247**, **MJM249**, **MJM253** y **MJM255**) y que sustituciones adicionales sobre el anillo bencénico conllevan, en general, una pérdida de actividad. Al igual que ocurre con la actividad IMAO-B de estos derivados, la presencia de sustituyentes hidroxilo en

posición 4 del núcleo de cumarina disminuye la actividad inhibidora de AChE mientras que un metilo en posición 6 (**MJM324**) la incrementa. La sustitución isostérica del anillo bencénico por un heteroarilo conduce a la pérdida de la actividad. Además, nuestros resultados ponen de manifiesto la importancia de la sustitución en posición 3 del núcleo de cumarina para la obtención de IChE. Los derivados de 7-benzamido, 7-heteroarilo y 7-alquilamidocumarina presentados en esta memoria carecen de actividad relevante sobre las ChEs.

También los análogos híbridos curcumina-cumarina carecen de una actividad inhibidora de AChE destacable, siendo en general menos activos que la curcumina. Sin embargo, algunos de ellos presentan una actividad ligeramente superior a la curcumina sobre la BuChE. Aun así, los resultados obtenidos nos permiten concluir que este *scaffold* no es adecuado para la obtención de inhibidores de ChE.

Aunque no disponemos de datos experimentales sobre el modo de inhibición de la AChE para nuestros derivados de 3-benzamidocumarina, los inhibidores de AChE con estructura cumarínica descritos en la bibliografía, en general, se unen tanto al sitio activo catalítico como al PAS de la enzima y por tanto son capaces de inhibir, en mayor o menor medida, la agregación de A β inducida por AChE¹⁶⁸.

6.3. DERIVADOS DE CUMARINA CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE BACE1

Otra alternativa para disminuir la formación de placas de A β en los pacientes de EA es mediante la inhibición de la BACE1. La inhibición de esta enzima podría ofrecer un abordaje interesante para el tratamiento de la EA, pues al frenar o disminuir el procesamiento de la APP hacia A β , se incrementa la vía no amiloidógena de la APP, reduciéndose la formación de los péptidos A β ₄₀ y A β ₄₂ que son los que más tienden a agregarse y que más se relacionan con la formación de las placas de A β ^{128,129}.

Hasta la fecha no hay ningún fármaco comercializado con este mecanismo de acción. Esto puede ser debido, al menos en parte, a la conformación de la enzima. Como ya se ha indicado previamente, la BACE1 presenta una gran cavidad en el sitio activo de la enzima, de forma que hasta el momento las moléculas descritas, capaces de unirse a esta enzima y ejercer una actividad inhibidora *in vitro* de la misma, han sido

principalmente peptidomiméticos. Sin embargo, estos peptidomiméticos son estructuras de gran tamaño y alto PM, por lo que no presentan características farmacocinéticas adecuadas para el paso a través de membranas biológicas, mucho menos lograr penetrar a través de la BHE y poder acceder al SNC²⁴⁷.

Por ello, resulta de interés el desarrollo de nuevos inhibidores no peptídicos con un tamaño lo suficientemente elevado para unirse al sitio activo con alta afinidad, pero por otra parte, lo suficientemente pequeños para tener un perfil farmacocinético favorable que les permita conseguir una adecuada penetración en el SNC. Como se describe en la revisión bibliográfica, existen cumarinas y furanocumarinas con sustituyentes voluminosos como bergamotina y 8-geraniloxipsoraleno que han resultado inhibidores de BACE1²⁴⁹. A priori, parecería que los híbridos curcumina-cumarina aquí descritos, debido al tamaño mayor de la molécula, podrían resultar inhibidores de esta enzima. Los resultados muestran que este tipo de derivados carecen de actividad; sin embargo, derivados de cumarina que presentan un menor volumen molecular como **CUM71**, **MJM430** y **MC78**, muestran actividad inhibidora de BACE1 en el rango micromolar, lo que constituye un punto de partida interesante y esperanzador para encontrar, en un futuro, estructuras capaces de inhibir la BACE1 y, que además, cuenten con un perfil farmacocinético adecuado.

Los resultados obtenidos no permiten establecer una relación entre la estructura de los derivados de cumarina descritos en esta memoria y su actividad inhibidora de BACE1; sin embargo, es posible observar algunas similitudes entre ellos y otros derivados de cumarina descritos en la bibliografía. 7-tiofenamido-4-metilcumarina (**MJM340**) presenta un sustituyente voluminoso en la posición 7, al igual que el aurapteno con un grupo geraniloxi en esa posición y también inhibidor de BACE1²⁴⁹. El primer inhibidor dual de AChE y BACE1, el **AP2238**^{264,267,268}, por su parte, presenta un fenilo sustituido unido al núcleo cumarina en posición 3, algo que comparte con el compuesto **CUM71**.

6.4. DERIVADOS DE CUMARINA CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE COX

El interés en conocer la actividad de los derivados de cumarina recogidos en esta memoria sobre la enzima COX, se basa en la participación de esta enzima en eventos

fisiológicos y patológicos con un temprano y marcado componente inflamatorio, algo que ocurre en las enfermedades neurodegenerativas como la EP y la EA. Durante mucho tiempo se tendió a pensar que las propiedades antiinflamatorias estaban más asociadas a la inhibición de la COX-2 y los efectos secundarios (principalmente aquellos que afecta al tubo digestivo) a la inhibición de la COX-1. Sin embargo, en los últimos años se ha visto que la COX-1 es una diana a tener en cuenta en el desarrollo de fármacos que eviten o reviertan los procesos de neuroinflamación. Una respuesta predominante a todos los tipos de lesiones en el SNC es la activación de la microglía en la que se encuentra de forma predominante la COX-1. Por ello, cabe pensar que la COX-1 podría tener un papel importante en el proceso neuroinflamatorio. Se sabe que diferentes estímulos entre los que se incluyen los ya mencionados LPS, el péptido A β , el MPTP, priones, la lesión neuronal y factores derivados de la microglía, pueden activar esta microglía induciendo mediadores pro-inflamatorios tales como la iNOS, la NADPH oxidasa y la COX-2. Como consecuencia, se produce la liberación de citocinas como la IL-1 β , la IL-6 y el TNF- α , quimiocinas, NO y PGs, todos ellos, asociados con la neuroinflamación. La COX-2, presente principalmente en las neuronas piramidales, podría jugar un papel importante en condiciones en las que las neuronas se ven directamente afectadas, participa principalmente en el aumento de la síntesis de PG en respuesta a las lesiones neuronales, como la isquemia y la excitotoxicidad. Por lo tanto, la COX-1 es responsable de la respuesta primaria a los estímulos inflamatorios, mientras que la COX-2 es responsable de la respuesta secundaria, y viceversa, en caso de daño neuronal, es la COX-2 la responsable de la respuesta primaria, mientras que la COX-1 es responsable de la respuesta secundaria, tras la activación de la microglía⁴³⁰.

En el cerebro de pacientes con EA se encontraron células de la microglía que expresaban COX-1 alrededor de las placas amiloides viéndose que, por ejemplo, el uso de indometacina es capaz de ejercer un efecto beneficioso sobre el deterioro cognitivo de los pacientes con EA y que el uso de dosis bajas de aspirina se asocia con un menor riesgo de padecer la EA. Por otro lado, se observó una regulación positiva de COX-2 en las etapas tempranas de la EA y una regulación negativa en las etapas avanzadas. Además, los ensayos aleatorios con los inhibidores preferenciales de COX-2 celecoxib o rofecoxib no tuvieron efecto⁴³¹.

Existen muchas cumarinas naturales o sintéticas que han evidenciado propiedades antiinflamatorias, descubriéndose que la sustitución con grupos hidroxilos en las posiciones 4 y 7 es interesante para esta actividad²¹⁶. En base a esto, entre las cumarinas descritas en esta memoria, se seleccionaron para estudiar su actividad sobre la COX, aquellas que presentan hidroxilos fenólicos en su estructura correspondientes a las series de 3-fenilcumarina, 3 ó 4-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina y 4,4'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina. Además estos derivados presentan en su estructura un análogo de RESV o cumarina y ambos compuestos también han demostrado propiedades antiinflamatorias relacionadas con la inhibición de esta enzima.

La evaluación se llevó a cabo de forma general sobre la COX-1 aislada de plaquetas humanas. Solo para un número reducido de compuestos, se llevó a cabo también el estudio de la actividad inhibidora sobre la COX-2 utilizando enzima recombinante humana, debido al alto coste de esta enzima.

En la bibliografía se ha descrito el ciclocumarol, con estructura de 3-bencilcumarina²⁶⁰, con actividad inhibidora de COX. Nuestros resultados demuestran que las 3-fenilcumarinas presentan también un gran interés. La presencia de grupos hidroxilo en posiciones *meta* y *meta/para* del sustituyente fenilo es importante para esta actividad. Para los derivados que presentan sustituyentes hidroxilo tanto sobre el núcleo de cumarina como sobre el sustituyente fenilo, al incrementarse el número, disminuye la actividad. Muchos de los derivados de esta serie (**CUM11**, **CUM32**, **CUM 61**, **SMB1**, **JLG9b**) presentan una actividad sobre la COX-1 similar a la mostrada por la indometacina o diclofenaco. Aquellos en los que dos grupos hidroxilo sobre la cumarina ocupan posiciones alternas (5 y 7 ó 6 y 8) son selectivos sobre esta isoforma (**CUM32**, **CUM51**, **CUM61**). Es destacable la actividad de **CUM51**, casi 4 veces más potente que la indometacina sobre COX-1; su potencia y sobretodo su selectividad lo convierten en una herramienta farmacológica útil para estudiar el papel de la COX-1 en la neuroinflamación iniciada en la microglía y su implicación en la activación secundaria de la COX-2 y quizá también en un potencial candidato para el desarrollo de fármacos.

Otros derivados como **CUM71** y **SMA1**, aunque carecen de selectividad, son más potentes que la indometacina o el diclofenaco. Teniendo en cuenta los efectos beneficiosos sobre el deterioro cognitivo en la EA asociados a la indometacina, estas

moléculas podrían tener un potencial interés para el desarrollo de fármacos antiinflamatorios con interés en la EA.

En la bibliografía se han descrito derivados de curcumina para los que la inhibición de la expresión de COX-2 es más importante que la inhibición de su actividad enzimática³⁷⁸. Los resultados sobre la actividad inhibidora de COX-1 para los híbridos curcumina-cumarina descritos en esta memoria, nos permiten observar que la cadena fenilalquénílica debe unirse en la posición 4 del núcleo de cumarina, los derivados de 3-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina no presentan actividad frente a COX-1. En general, los derivados de 4-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina presentan actividad en el rango de concentración micromolar, similar a la curcumina ($CI_{50} \approx 50 \mu M$)⁴³², pero la naturaleza y posición de los sustituyentes condiciona su potencia.

6.5. DERIVADOS DE CUMARINA CON ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA

Para evaluar la actividad neuroprotectora de los derivados de cumarina correspondientes a las distintas series estudiadas en esta tesis doctoral, se utilizó un modelo de toxicidad inducida por radicales libres tanto en células de línea SH-SY5Y como en neuronas de corteza motora de rata. Este modelo, ampliamente aceptado, consiste en aportar una fuente de ERO exógena incubando las células con H_2O_2 ^{433,434}.

Los resultados encontrados para los análogos híbridos resveratrol-cumarina correspondientes a la serie de derivados de 3-fenilcumarina muestran, de forma general, que la actividad neuroprotectora es mayor para aquellos compuestos que presentan un mayor número de grupos hidroxilo en su estructura, siendo especialmente relevante la presencia de estos sustituyentes en posiciones *meta/para* o *meta* del sustituyente fenilo. Los derivados de 3-heteroarilcumarina que presentan dos grupos hidroxilo en las posiciones 7 y 8 del núcleo de la cumarina (**MJM452** y **MJM471**) presentan igualmente actividad neuroprotectora; esto pone de manifiesto la importancia de la presencia de un grupo catecol o pirogalol para que los análogos híbridos resveratrol-cumarina presenten esta actividad.

Además es importante señalar que los derivados de 3-fenilcumarina presentan una actividad neuroprotectora más marcada y generalizada en neuronas de corteza motora que en células SH-SY5Y. En general, aquellos que muestran efectos neuroprotectores frente a H_2O_2 en células SH-SY5Y los muestran también en neuronas, pero esto no ocurre a la inversa. A concentración 10 μM , los derivados con actividad neuroprotectora en neuronas de corteza motora son **CUM11**, **CUM51**, **CUM71**, **CUM81**, **CUM91**, **SMA1**, **JLG5b**, **JLG12b** y **MJM43b**. Esta actividad neuroprotectora se pierde en las células de SH-SY5Y para los compuestos **CUM11**, **CUM51**, **CUM71**, **CUM81**, **JLG12b**. Como excepción, **CUM21** y **CUM21C** que presentan actividad neuroprotectora en células de línea SH-SY5Y, pero únicamente una tendencia a un efecto protector sobre las neuronas de cultivo primario. Es conveniente señalar que aunque las células SH-SY5Y no diferenciadas se usan ampliamente como modelo de línea celular para estudios en neurociencia, carecen de muchas propiedades neuronales, lo que les confiere una diferente sensibilidad frente a sustancias neurotóxicas y neuroprotectoras⁴³⁵.

Los derivados de 3 ó 7-amidocumarina estudiados, en general, carecen de actividad neuroprotectora. Los resultados indican que la presencia de un grupo hidroxilo en la molécula no es suficiente para la actividad neuroprotectora, ya que esta se aprecia únicamente para 4-hidroxi-3-(3',4',5'-trimetoxibenzamido)cumarina (**MJM229**) y 3-(4'-clorobenzamido)-4-hidroxycumarina (**MJM260**) en neuronas de corteza motora de rata tratadas con H_2O_2 .

En las diferentes series de análogos curcumina-cumarina se han identificado dos derivados **H1J4** y **H1K5** con efecto neuroprotector en células SH-SY5Y y tres derivados **B1B**, **III** y **L1L** con efecto neuroprotector en neuronas de corteza motora de rata. Aunque todos los compuestos con actividad neuroprotectora presentan un elevado número de grupos hidroxilo, este no parece ser el único condicionante para la actividad neuroprotectora de este tipo de derivados, ya que la mayoría de los compuestos carecen de esta actividad.

Estos análogos son moléculas con un alto peso y volumen molecular que en algunos casos presentan problemas de solubilidad en el medio de cultivo. Nuestros resultados indican que su formulación en nanopartículas biodegradables mejora la solubilidad y su

paso a través de la membrana celular y **H1K5** y **H1i2** pasan de tener un efecto neurotóxico a concentración 1 μM a un efecto neuroprotector estadísticamente significativo frente a H_2O_2 a concentración 10 nM. Para explicar este efecto neuroprotector es necesario recurrir a un mecanismo de acción, la *hormesis*, que comparten varios compuestos fitoquímicos entre los que se encuentra la curcumina⁴³⁶. Este fenómeno se define como una estimulación de la protección celular a dosis bajas y una inhibición de la misma a dosis altas de compuesto, lo que resulta en una curva dosis respuesta en forma de J o de U invertida. Un compuesto tóxico que produzca efecto de *hormesis* presenta a dosis bajas el efecto contrario al que tiene a dosis más elevadas, que es lo que se aprecia para estos híbridos curcumina-cumarina.

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos está ampliamente descrita en la bibliografía⁴³⁷ y podría justificar los efectos neuroprotectores mostrados por muchos de los derivados de cumarina descritos en esta memoria. Los antioxidantes secuestran radicales libres retardando la peroxidación lipídica y protegiendo a las células frente a ERO. Para determinar la actividad secuestradora de radicales libres de nuestros derivados de cumarina se eligió el método de DPPH[•] que evalúa la actividad antioxidante mediante una reacción de transferencia de un electrón o un átomo de hidrógeno al radical libre.

Los derivados de 3-fenilcumarina con hidroxilos fenólicos muestran una elevada actividad secuestradora de radicales libres. Esta actividad se incrementa con el número de grupos hidroxilo presentes, siendo los derivados más potentes aquellos que presentan un grupo catecol o pirogalol en su estructura (**CUM11**, **CUM71**, **SMA1**, **SMB1**, **JLG5b**, **JLG12b** y **MJM43b**) con una CE_{50} inferior a 10 μM en todos los casos e inferior para muchos de ellos a la CE_{50} de la vitamina C utilizada como referencia. **CUM61**, que también presenta un grupo pirogalol, muestra una CE_{50} más elevada ($CE_{50} = 42,45 \mu\text{M}$), lo que podría explicar su ausencia de actividad neuroprotectora frente a H_2O_2 ya que en los ensayos de neuroprotección la concentración de compuesto utilizada es 10 μM . También es destacable que **SMB1**, un secuestrador de radicales libres muy potente ($CE_{50} = 2,59 \mu\text{M}$), carece de actividad neuroprotectora, por lo que podría haber otros mecanismos de acción implicados en esta actividad.

Entre los derivados de 3-heteroarilcumarina únicamente **MJM452** y **MJM471**, ambos con un grupo catecol en su estructura, muestran una potente actividad secuestradora de radicales libres que podría justificar, al menos en parte, su actividad neuroprotectora. Los derivados de las series 3-(6-oxo-1,6-dihidropiridazin-3-il)cumarina y 3-(piridazin-3-il)cumarina, que no muestran actividad neuroprotectora, carecen también de actividad como secuestradores de radicales libres.

En las series de derivados de 3 ó 7-amidocumarina, los mejores resultados de neutralización de radicales libres corresponden a los derivados de 3-benzamido-4-hidroxycumarina, siendo esta actividad inferior para los derivados de 3-heteroarilamido-4-hidroxycumarina y nula para los derivados de 7-amidocumarina posiblemente porque estos carecen de grupos hidroxilo en su estructura. Aunque todos los derivados de 3-benzamido-4-hidroxycumarina muestran una actividad secuestradora de radicales libres similar (aproximadamente 50% de los radicales captados a concentración 100 μ M), únicamente **MJM229** y **MJM260** muestran actividad neuroprotectora, lo que una vez más pone de manifiesto la existencia de otros mecanismos implicados en esta actividad.

En las series de análogos híbridos curcumina-cumarina, los mejores resultados de neutralización de radicales libres corresponden a los derivados de 4-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina. Los resultados obtenidos no permiten establecer una REA y tampoco parece que la actividad neuroprotectora mostrada por algunos de estos análogos esté relacionado con su actividad secuestradora de radicales libres. Únicamente **L1L** presenta una $CE_{50} = 15,41 \mu$ M que podría explicar la actividad neuroprotectora pero **A1J**, **A1L**, **B1K**, **J1J** y **K1K** con CE_{50} similar o inferior carecen de esta actividad.

Los derivados de cumarina **SMA1**, **JLG5b**, **MJM471** y **CUM71**, con actividad neuroprotectora, se seleccionaron para estudiar también su actividad antioxidante en células SH-SY5Y. Para evaluar la generación de ERO por las células, como consecuencia del tratamiento con H_2O_2 , se utilizó la sonda fluorescente DCFDA que permite observar un incremento en la intensidad de fluorescencia debido a la oxidación del acetato de DCF. Los resultados obtenidos sugieren que **CUM71**, **JLG5b** y sobre

todo **MJM471** pueden prevenir la formación intracelular de ERO respecto de las células tratadas exclusivamente con H_2O_2 .

Por último, se seleccionaron los derivados de 3-fenilcumarina **SMA1** y **JLG5b**, ambos con acción neuroprotectora frente a H_2O_2 tanto en neuronas de cultivo primario de corteza motora como en células de línea SH-SY5Y, para evaluar un posible mecanismo neuroprotector a nivel genético estudiando las modificaciones en la expresión de NF- κ B, Nrf2, Casp3 y TNF- α . Además, ambos compuestos presentan capacidad secuestradora de radicales libres y **SMA1**, resultó ser un potente inhibidor de COX-1 y COX-2, otro mecanismo que justifica su acción neuroprotectora. Como ya se ha comentado en la introducción de esta memoria NF- κ B es un factor de transcripción que actúa como un regulador pleiotrópico de genes que controlan procesos fisiológicos y procesos patológicos asociados con la neurodegeneración. La actividad de NF- κ B es inducida por ERO e incrementa la producción de enzimas pro-inflamatorias implicadas en la neurodegeneración como COX-2 e iNOS^{225,299,438}. La enzima Casp3 es un miembro de la familia de endoproteasas que está implicada en la regulación de la apoptosis en las enfermedades neurodegenerativas como la EP y la EA⁴³⁹. TNF- α es el miembro prototípico de una gran familia de citocinas que juegan un papel importante en la regulación del sistema inmune innato y adaptativo. Los niveles persistentemente elevados de TNF- α se han implicado en la inflamación crónica y se han asociado con las enfermedades neurodegenerativas. Por lo tanto, el bloqueo de la señalización de TNF- α se plantea como una alternativa para el tratamiento de estas enfermedades. Nrf2 es un factor de transcripción conocido por su función en el control de la expresión basal e inducible de una variedad de enzimas antioxidantes y desintoxicantes. Su capacidad para regular el metabolismo intermedio y la función mitocondrial hace que la activación de Nrf2 sea una estrategia atractiva e integral para el tratamiento de los trastornos neurodegenerativos⁴⁴⁰. Nuestros resultados muestran que **JLG5b** y **SMA1** no modifican la expresión del ARNm codificante para estos mediadores de inflamación y apoptosis de forma estadísticamente significativa. Sin embargo, ambos, pero sobre todo **JLG5b** muestra una tendencia a aumentar la expresión del ARNm codificante para Nrf2. Será necesario estudiar en un futuro su acción sobre la expresión de enzimas antioxidantes reguladas por Nrf2 como SOD y CAT para comprobar si este mecanismo está también implicado en su actividad neuroprotectora.

6.6. CUMARINAS CON ACTIVIDAD MULTIDIANA

Como se ha comentado repetidas veces a lo largo de esta memoria, para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la EP y la EA es interesante disponer de fármacos multidiana capaces de actuar de forma simultánea sobre múltiples dianas implicadas en la patogenia de la enfermedad.

En la revisión bibliográfica se han descrito numerosos derivados de cumarina con actividad sobre alguna de las dianas implicadas en la EP y la EA y también algunos derivados que presentan actividad simultáneamente sobre varias de esas dianas.

Los resultados de actividad descritos anteriormente para los derivados de cumarina estudiados en esta tesis doctoral nos han permitido identificar varios ligandos multidiana:

- Compuestos con actividad dual inhibidores de la MAO-B y la AChE o la BuChE: **CUMIa** y **MJM451**, dos análogos híbridos resveratrol-cumarina, presentan actividad inhibidora de MAO-B/BuChE con valores de CI_{50} similares sobre ambas enzimas y **MJM249**, **MJM253**, **MJM254** y **MJM324**, todos ellos derivados de 3-benzamidocumarina, presentan actividad inhibidora de MAO-B/AChE.
- **CUM71**, un análogo híbrido resveratrol-cumarina, es un inhibidor de BACE1/COX-1/COX-2 que muestra actividad neuroprotectora frente al estrés oxidativo tanto en células SH-SY5Y como en neuronas de corteza motora de rata. Además de la inhibición de las isoformas de la COX, se han identificado otros mecanismos que justifican su actividad neuroprotectora como su capacidad para secuestrar radicales libres y la inhibición de la generación de ERO intracelular. **MJM340**, un derivado de 7-heteroarilamidocumarina, es un inhibidor dual MAO-B/BACE1.
- Los análogos híbridos resveratrol-cumarina **JLG5b** y **MJM43b** y curcumina-cumarina **A1L**, **H1K5**, **I1I**, son IMAO que además presentan actividad neuroprotectora frente al estrés oxidativo por un mecanismo independiente de la inhibición de la actividad enzimática, son secuestradores de radicales libres y

JLG5b inhibe además la generación de ERO intracelular mientras que **A1L** e **III** son inhibidores de COX-1.

Estos resultados ponen de manifiesto el interés de los análogos híbridos resveratrol-cumarina, curcumina-cumarina y los derivados de 3 ó 7-amidocumarina para el desarrollo de fármacos multidiana.

6.7. NEUROTOXICIDAD, PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y PREDICCIÓN DE PASO A TRAVÉS DE BHE

Una de las principales complicaciones del desarrollo de nuevos fármacos radica en los problemas que presentan muchos compuestos químicos para su paso a través de membranas celulares lo que condiciona los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación (ADME). Otro de los problemas es su posible toxicidad.

Por ello, previamente a la realización de los estudios *in vivo*, se realizaron estudios de neurotoxicidad de los nuevos derivados de cumarina en células de línea SH-SY5Y y, de forma complementaria, en cultivos primarios de neuronas de corteza motora de fetos de rata Wistar Kyoto para establecer su toxicidad en un sistema que no sea una línea celular inmortalizada. Para la determinación de la viabilidad celular, se empleó el método de reducción del MTT que es una medida del metabolismo celular, como se explicó en la metodología. Para poder comparar los resultados obtenidos, todos los derivados de cumarina se estudiaron a concentración 10 μ M, una concentración en el rango de la de los compuestos con actividad y a la que se evitan los problemas de precipitación que pueden aparecer para algunos de ellos a concentraciones superiores.

Desde hace años, se trabaja con la denominada regla de los 5 o regla de Lipinski en la que se recogen una serie de propiedades físico-químicas comunes a todas aquellas moléculas que presentan buenas propiedades de solubilidad y permeabilidad⁴⁰⁶. La regla de Lipinski predice que la mala absorción o penetración de un fármaco es más probable cuando hay más de cinco donantes de enlaces de hidrógeno, más de 10 aceptores de enlaces de hidrógeno, el peso molecular es mayor a 500 Da y LogP es mayor que 5. Por ello, se determinaron las propiedades físico-químicas de estos compuestos y se llevó a cabo la predicción teórica de su paso a través de membranas celulares y específicamente

a través de la BHE. Para algunos derivados de las series de 3-fenilcumarina y 3-benzamidocumarina, esta predicción se realizó también mediante estudios *in vitro* usando la metodología de membranas artificiales paralelas (PAMPA).

Entre las diferentes series de análogos híbridos resveratrol-cumarina, los derivados de 3-piridazilcumarina son los que presentan los mayores problemas de toxicidad. **MC99**, **MC144**, **MC150**, **MC151**, **MC152** y **MC159** presentan efecto neurotóxico sobre neuronas de corteza motora de rata pero esta toxicidad desaparece en las células SH-SY5Y. Frente a las neuronas de corteza motora de rata, la línea celular SH-SY5Y es de origen humano, pero los resultados sobre la carencia de neurotoxicidad de estos derivados de 3-piridazinilcumarina en estas células deben de ser tomados con cautela debido a la posibilidad de resistencia a los fármacos que presentan las células tumorales. Un comportamiento similar presentan la 7-metoxi-(4-hidroxifenil)cumarina (**CUM10**) y la 8-hidroxi-3-(tiofen-2-il)cumarina (**CUM450**). Por el contrario **MC157** carece de toxicidad sobre neuronas de corteza motora de rata pero resulta neurotóxico en las células SH-SY5Y.

Ninguno de los derivados de 3 ó 7-amidocumarina presenta neurotoxicidad en neuronas de corteza motora de rata. Sin embargo, los derivados de 7-benzamidocumarina con un único sustituyente en posición *para* de la benzamida (**MJM273**, **MJM275**, **MJM277**, **MJM279**) y la 7-(tiofen-2-ilamido)cumarina (**MJM340**) mostraron una toxicidad significativa en células SH-SY5Y, contrariamente a lo esperado, lo que se explica por la diferente sensibilidad de estas células ya comentada anteriormente.

En las distintas series de los análogos híbridos curcumina-cumarina, se han identificado 2 derivados: 3,3'-(3,5-dioxohepta-1,6-dien-1,7-diil)biscumarina (**H1i2**) y 6,7-dihidroxi-3-(7-(3',4',5'-trihidroxifenil)-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)-cumarina (**H1L3**) que, a concentración 10 μ M, presentan efectos neurotóxicos en células SH-SY5Y. **H1i2**, formulado en nanopartículas biodegradables, mantiene los efectos neurotóxicos a concentración 1 μ M. Además, el derivado **H1K5** presenta toxicidad a concentraciones más bajas (1 μ M o 100 nM) cuando es administrado en forma de nanopartículas biodegradables. Un efecto similar se observa para la curcumina que a concentración 10 μ M no tiene efecto sobre la viabilidad celular pero administrada a

concentración más baja (1 μM) en forma de nanopartículas presenta también neurotoxicidad. Este efecto puede ser debido a su limitada solubilidad en el medio de cultivo y a una mayor penetración en la célula cuando estos compuestos son formulados como nanopartículas.

Ninguno de los análogos híbridos resveratrol-cumarina ni los derivados de 3 ó 7 amidocumarina presentan ninguna violación de la regla de Lipinski por lo que, al menos teóricamente, sus propiedades físico-químicas serían en principio apropiadas para permitir el paso a través de membranas celulares. Sin embargo, la predicción de paso a través de BHE realizada con el programa “CBligand-BBB predictor” arroja resultados diferentes. Únicamente los derivados de las series de 3-fenilcumarina (**CUMa** y **CUMIa**) y 3-heteroarilcumarina (**MJM450**, **MJM451**, **MJM465** y **MJM470**) con un único sustituyente hidroxilo en su estructura, atravesarían la BHE. Para los derivados de la serie 3-(6-oxo-1,6-dihidropiridazin-3-il)cumarina, en general, la predicción resulta negativa cuando existe un sustituyente metoxilo sobre el núcleo de cumarina, mientras que al menos teóricamente, todos los derivados de la serie 3-(piridazin-3-il)cumarina pueden atravesar la BHE.

Entre los derivados de las diferentes series de 3-amidocumarinas, únicamente **MJM195** con un sustituyente ciclohexilamido presenta una predicción positiva para su paso a través de BHE. La predicción es más favorable para los derivados de 7-amido-4-metilcumarina; de hecho, 7-benzamido-4-metilcumarina (**MJM272**) atravesaría la BHE y el mismo resultado se obtiene para aquellos derivados que presentan sustituyentes apolares (metilo, cloro) sobre el anillo bencénico (**MJM275** y **MJM277**). Sin embargo la presencia de sustituyentes polares (metoxilo o nitro) hace que la predicción sea negativa. De la misma forma, para las series de 7-heteroarilamido y 7-alkilamidocumarinas el incremento de la polaridad del sustituyente amida hace que la predicción de paso a través de BHE favorable para **MJM340** y **MJM430** pase a ser negativa para los otros derivados.

Los análogos híbridos curcumina-cumarina, aunque no presentan violaciones de la regla de Lipinski (con la excepción de aquellos con un sustituyente de naturaleza aminoacídica), sí tienen valores elevados para todas las propiedades físico-químicas estudiadas: LogP, PM, TPSA, nOHNH, nOH y VM y la predicción de paso a través de

BHE es negativa para todos ellos, al igual que para la curcumina. Los datos de neurotoxicidad y neuroprotección obtenidos parecen indicar que la formulación de estos derivados en nanopartículas biodegradables facilita su paso a través de las membranas celulares.

Sin embargo, no podemos olvidar que estos resultados corresponden a predicciones teóricas que nunca serán definitivas para conocer la capacidad de paso a través de membranas biológicas de una nueva molécula. Además, los resultados de la predicción teórica son, en muchos casos, contradictorios con los resultados de los ensayos *in vitro* usando la metodología PAMPA. Según estos resultados, derivados de la serie de 3-fenilcumarina como **CUM21** para el cual la predicción de paso a través de BHE había resultado negativa, accedería al SNC. Lo mismo ocurre para algunos derivados de la serie de 3-benzamidocumarina como **MJM223**, **MJM247** y **MJM257**. Resulta curioso que todos estos derivados contienen sustituyentes metoxilo en su estructura cuando la predicción teórica indica que la presencia de estos grupos contribuye negativamente al paso a través de BHE.

6.8. ESTUDIOS *IN VIVO*: OFT Y ORT

En el desarrollo de esta tesis doctoral, además de los estudios *in vitro* y las predicciones teóricas, se llevaron a cabo estudios *in vivo*. Para ello, previamente se seleccionaron los derivados de cumarina más interesantes como inhibidores de MAO-B y AChE. Utilizando el test de campo abierto, se evaluó la actividad *in vivo* en modelo farmacológico de EP de los compuestos **CUM21**, **MJM272**, **MJM470**, **MJM511** y **MC151**. El test de reconocimiento de objeto se utilizó en ratones modelo farmacológico de EA para evaluar la actividad *in vivo* del compuesto **MJM255**.

Se llevó a cabo un estudio sobre el efecto de estos compuestos en ratones sin tratamiento previo y su posible toxicidad desde su administración y durante los cinco días posteriores a la misma transcurridos hasta su sacrificio. No se observa toxicidad apreciable a simple vista en los animales que reciben los compuestos.

De los derivados de cumarina analizados, los compuestos **MJM470** (derivado de 3-(tiofen-2-il)cumarina) y **MC151** (derivado de 3-(piridazin-3-il)cumarina) ejercen un

aumento estadísticamente significativo en los parámetros evaluados (distancia recorrida, velocidad y tiempo total en movimiento). Ambos son derivados 7-sustituidos de 3-heteroarilcumarina siendo tiofeno el heterociclo en **MJM470** y piridazina en **MC151**; los dos presentan un átomo de bromo sobre el heterociclo. Ambos derivados resultan activos *in vivo* a las dos dosis evaluadas (100 y 10 mg/Kg), manifestando una variación en los parámetros evaluados equiparable a la del fármaco de referencia utilizado, el R-(-)-deprenilo (selegilina). Además, es interesante señalar que, dependiendo de la dosis, es uno u otro el compuesto más activo. Así, el compuesto que muestra mayor actividad a la dosis de 100 mg/Kg es el **MJM470** (en combinación con LD:B), mientras que a la de 10 mg/Kg es el **MC151** (en combinación con LD:B) el que presenta una actividad más interesante. Esto parece indicar que el **MC151** es un compuesto más potente que el **MJM470**.

Como hemos dicho previamente, la reserpina es capaz de bloquear el VMAT, dando lugar a hipocinesia al impedir el almacenamiento de la DA y provocar su depleción. Ante los resultados observados, se podría señalar que quizá el **MJM470** y el **MC151** no sólo actúan como inhibidores de la isoforma B de la MAO *in vitro*, sino que también ejercen esta actividad *in vivo*. Los resultados obtenidos con ambos derivados de cumarina en combinación con LD:B en ratones reserpinizados podrían explicarse si actuaran como IMAO-B, puesto que inhibirían la metabolización de la DA y se aumentaría el tiempo de permanencia de la misma en el espacio sináptico estriatal.

Nuestro grupo ya había evaluado *in vivo* derivados de carbamatocumarina en los que el R-(-)-deprenilo en ratones normales disminuía, de forma estadísticamente significativa, la distancia recorrida, la velocidad y el tiempo en movimiento en pruebas de campo abierto. En los resultados previamente señalados en esta memoria, el R-(-)-deprenilo no sólo no disminuyó estos parámetros, sino que por el contrario, los incrementó. En la literatura se han encontrado los dos tipos de resultados relatados respecto al efecto del R-(-)-deprenilo sobre la actividad motora^{430,431}. El derivado de carbamatocumarina evaluado *in vivo* a 10 mg/Kg no mostró efecto, necesiándose 100 mg/Kg para encontrar una tendencia a incrementar los parámetros evaluados en los ratones reserpinizados. Relacionando los resultados previamente señalados en la literatura y comparándolos con los que se relatan en esta memoria, parece que los

derivados de 3-heteroarilcumarina dan lugar a IMAO-B más potentes *in vivo* que el derivado de carbamatocumarina descrito en la bibliografía⁴¹⁰.

El inhibidor de AChE más potente de todos los evaluados es el derivado de 3-benzamidocumarina **MJM255** que se selecciona para su estudio *in vivo* en el test de reconocimiento de objeto.

Los ratones tratados previamente con escopolamina se utilizan en el test de reconocimiento de objeto para tratar de dilucidar si el compuesto **MJM255** es capaz de inhibir la AChE *in vivo* y, en consecuencia, aumentar el tiempo de permanencia del neurotransmisor en el espacio sináptico y contrarrestar los efectos ejercidos por el antagonista del receptor muscarínico escopolamina. Como hemos señalado en la revisión bibliográfica, en la EA existe destrucción de neuronas colinérgicas que disminuyen los niveles del neurotransmisor ACh¹⁶. Pese a que sigue siendo un tratamiento sintomático que no frena o revierte el curso de la enfermedad, la terapéutica actual para el tratamiento de la EA se sustenta principalmente en tres IChE^{171,172}.

Pese a que los resultados son ciertamente difíciles de interpretar, el derivado de 3-benzamidocumarina, con un grupo nitro como sustituyente en el grupo benzamido, ejerce un efecto similar al mostrado por la eserina, el fármaco de referencia, pero su forma de manifestarse es más lenta. Esto se aprecia especialmente al evaluar el parámetro de frecuencia de acercamiento de los animales a los objetos. Este resultado podría indicar que el **MJM255** no sólo actúa como inhibidor de AChE *in vitro*, sino que sería compatible con un efecto colinérgico central de tipo indirecto. A pesar de que se necesitan estudios posteriores para seguir analizando el efecto de este derivado de 3-benzamidocumarina en animales y su presencia a nivel del SNC, el **MJM255** podría contemplarse como una prometedora molécula para el potencial tratamiento de la EA.

Para profundizar en el estudio de estos derivados que presentan actividad *in vivo* en los modelos farmacológicos de EP y EA, sería también interesante analizar su presencia, y la de sus metabolitos, a nivel cerebral.

6.9. BIODISPONIBILIDAD

En el proceso de descubrimiento de fármacos uno de los requerimientos habituales que se busca para un candidato, es que posea unas características óptimas que permitan desarrollar una forma oral con la que conseguir una concentración sistémica adecuada.

Conseguir una absorción sistémica suficiente es muy importante no solo para lograr el efecto farmacológico deseado, también existen razones clínicas y económicas que recomiendan maximizar la biodisponibilidad oral de las moléculas.

Una biodisponibilidad oral baja lleva a una mayor variabilidad interindividual en las concentraciones plasmáticas y a un peor control de los efectos de los fármacos, tanto de los deseados como de los indeseados⁴³².

Cuando se intenta conseguir una molécula para dosificación oral, la biodisponibilidad es una propiedad farmacocinética crítica. De ahí la importancia de esforzarse para alcanzar la máxima biodisponibilidad oral en el descubrimiento y desarrollo de un fármaco. Esto se intenta incluyendo estudios de farmacocinética en animales y con predicciones de las propiedades físico-químicas de los nuevos candidatos a fármacos.

La vía oral es la ruta más conveniente en pacientes con tratamientos crónicos, situación que se presenta en la EP y la EA. Por todo lo indicado, parece conveniente evaluar la biodisponibilidad *in vivo* de los nuevos derivados de cumarina **MJM470**, **MJM272**, **MJM255**, **MC151** y **CUM21** seleccionados por sus prometedores resultados en los experimentos *in vitro* inhibiendo las enzimas MAO o AChE.

En las pruebas *in vivo* llevadas a cabo en los animales de experimentación tras la administración oral o intraperitoneal de los nuevos derivados de cumarina, no ha sido posible cuantificar estos compuestos en las muestras analizadas. Esto hace imposible establecer una relación cuantitativa de las concentraciones en plasma de cada uno de ellos.

En las muestras de **CUM21** se ha podido detectar el compuesto pero sin poder cuantificarlo. Todas las muestras en las que se detecta **CUM21** se corresponden con la

administración previa del compuesto por vía i.p., lo que puede ser un indicio de que el compuesto presenta una mejor absorción por esta vía que por vía oral. La concentración en todas las muestras ha estado por debajo del límite de cuantificación de los métodos desarrollados, por lo que no ha sido posible establecer el perfil farmacocinético para el **CUM21**.

Como se ha indicado previamente, ninguno de los compuestos incumple la regla de Lipinski y todos ellos presentan unas propiedades físico-químicas suficientemente adecuadas para permitir su paso a través de membranas biológicas. No obstante la predicción teórica para atravesar BHE es negativa para los compuestos **MJM255** y **CUM21**.

El compuesto **CUM21** evidencia una fuerte actividad inhibidora frente a la MAO en los estudios *in vitro* pero su actividad ha sido inferior en los estudios *in vivo* sobre el SNC. Pese a la posibilidad de no correspondencia entre estudios *in vitro* e *in vivo*, es innegable la necesidad de los estudios *in vitro* y la utilidad de estas pruebas para la selección de candidatos en el desarrollo de fármacos. Por otra parte la detección del compuesto en las muestras de plasma parece estar de acuerdo con las predicciones teóricas de que posee simultáneamente buenas características de paso a través de barreras biológicas y malas de paso a través de la BHE. No parece ser este el caso del **MJM255** que es capaz de ejercer efectos sobre el SNC pero que no ha sido posible detectar en las muestras de plasma.

El hecho de apreciar actividad farmacológica sobre el SNC tras la administración i.p. sugiere que se produce absorción de los compuestos, pero que los niveles de absorción a las dosis estudiadas dan lugar a concentraciones por debajo del límite de cuantificación de los métodos desarrollados.

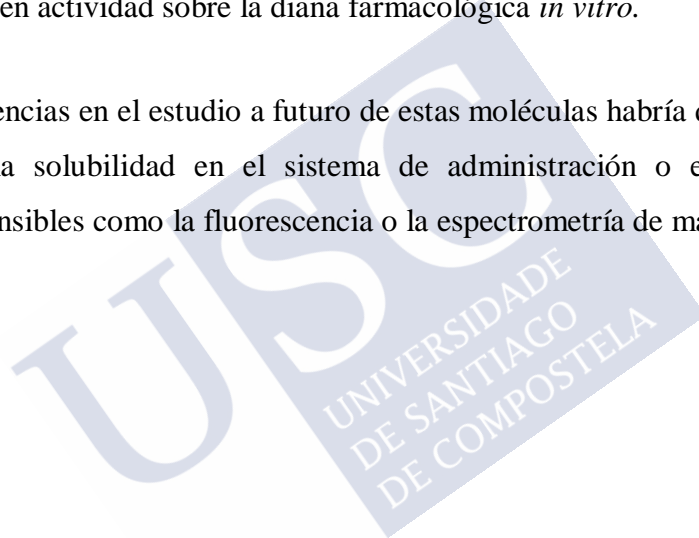
Los resultados también podrían ser indicativos de la gran actividad farmacológica de los compuestos **MJM470**, **MC151** y **MJM255**, ya que presentan actividad farmacológica a concentraciones plasmáticas muy reducidas o que esta sea debida a metabolitos activos de los mismos.

Si tenemos en cuenta los valores del reparto octanol/agua de los compuestos, indicador del carácter lipofílico de los mismos, también cabe la posibilidad de que se distribuyan de manera importante hacia los tejidos, lo que contribuiría a esa baja concentración plasmática.

Las concentraciones plasmáticas de las muestras de los compuestos que han mostrado efectos en los estudios *in vivo* sobre el SNC (**MJM470**, **MC151** y **MJM255**) han estado por debajo de los límites de detección de los métodos desarrollados.

Si un compuesto se absorbe poco y las concentraciones plasmáticas son bajas tras una dosis oral, pueden no conseguirse los efectos farmacológicos incluso cuando los compuestos poseen actividad sobre la diana farmacológica *in vitro*.

Como sugerencias en el estudio a futuro de estas moléculas habría que conseguir un incremento en la solubilidad en el sistema de administración o emplear técnicas analíticas más sensibles como la fluorescencia o la espectrometría de masas.





CONCLUSIONES



7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo y expuestos anteriormente nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. Los análogos híbridos resveratrol-cumarina convenientemente sustituidos mejoraron la actividad inhibidora y la selectividad sobre la isoforma B de la MAO con respecto al *trans*-RESV. La naturaleza del sustituyente en las posiciones 6, 7 y/ó 8 del núcleo de cumarina condiciona la potencia y la selectividad. Un halógeno (bromo) sobre el heteroarilo de 3-(tiofen-2-il)cumarina o 3-(piridazin-3-il)cumarina incrementa la actividad IMAO-B; **MC151** y **MJM470** resultaron ser los IMAO-B con mayor actividad en estas series.
2. Los derivados de 7-amido-4-metilcumarina resultaron, en general, más potentes como IMAO-B que los derivados de 3-amidocumarina. El compuesto más potente, 4-metil-7-(4'-clorobenzamido)cumarina (**MJM277**) presenta una CI_{50} en el rango de concentración submicromolar.
3. Los análogos híbridos curcumina-cumarina resultaron, en general, inhibidores menos potentes y selectivos sobre la isoforma MAO-B que la curcumina pero algunos de ellos, **A1K** y **A1L**, presentan mayor actividad que esta sobre la MAO-A.
4. Los diferentes derivados de cumarina estudiados, análogos híbridos resveratrol-cumarina, 3 ó 7-amidocumarinas y análogos híbridos curcumina-cumarina, inhiben la MAO-B de forma reversible.
5. Los derivados de 7-hidroxi-3-fenilcumarina **CUM1a** y **JLG9b** ó 7-hidroxi-3-heteroarilcumarina, **MJM451**, presentaron actividad inhibidora de BuChE. La sustitución sobre el fenilo o el heteroarilo conduce a una pérdida de la actividad. Un puente amido entre la cumarina y el fenilo originó 3-benzamidocumarinas (**MJM247**, **MJM249**, **MJM253** y **MJM255**) con actividad inhibidora de AChE,

- la presencia de sustituyentes sobre el grupo benzamido es necesaria para la actividad.
6. Los compuestos **CUM71**, **MC78** y **MJM340** presentaron una actividad inhibidora de BACE1 sin que se pueda establecer una REA para los derivados de cumarina correspondientes a las distintas series estudiadas.
 7. En general, los derivados de 3-fenilcumarina presentaron actividad inhibidora de la COX. **CUM32**, **CUM51**, **CUM 61**, en los que dos grupos hidroxilo sobre la cumarina ocupan posiciones alternas (5 y 7 ó 6 y 8) son selectivos sobre la COX-1. **CUM51**, **CUM71** y **SMA1** son más potentes que la indometacina o el diclofenaco. Algunos de los análogos híbridos curcumina-cumarina (**A1J**, **A1L**, **I1I**, **L1L**) presentaron una actividad inhibidora de COX-1 ligeramente superior o similar a la curcumina. La cadena fenilalquenílica debe unirse en la posición 4 del núcleo de cumarina, los derivados de 3-(7-fenil-3,5-dioxohepta-1,6-dien-1-il)cumarina no presentan actividad frente a COX-1.
 8. La presencia de un grupo catecol o pirogalol confiere actividad neuroprotectora a los análogos híbridos resveratrol-cumarina y curcumina-cumarina. En general estos derivados presentaron una potente actividad como secuestradores de radicales libres, lo que podría explicar su actividad neuroprotectora frente al estrés oxidativo. **CUM71**, **JLG5b** y **MJM471** previenen la formación intracelular de ERO. Además **JLG5b** y **SMA1** muestran una tendencia a aumentar la expresión del ARNm codificante para Nrf2, mecanismos adicionales que contribuyen a su actividad neuroprotectora.
 9. La formulación en nanopartículas biodegradables de los análogos híbridos curcumina-cumarina mejoró considerablemente la actividad neuroprotectora de estos derivados. **H1i2**, **H1K5** y **H1J4** en esta formulación presentaron actividad neuroprotectora a concentración 10 nM.
 10. Algunos de los análogos híbridos resveratrol-cumarina son candidatos con potencial terapéutico para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la EA o de la EP por su perfil multidiana. Las diferentes sustituciones permiten obtener

inhibidores duales de MAO-B/BuChE como **CUM1a** y **MJM451** o BACE1/COX como **CUM71**. Un sustituyente benzamido o heteroarilamido en posiciones 3 ó 7 del núcleo de cumarina originó también inhibidores duales MAO-B/AChE como **MJM249**, **MJM253**, **MJM254** y **MJM324** o MAO-B/BACE1 como **MJM340**. Muchos de estos derivados presentan además una acción neuroprotectora con un mecanismo de acción independiente de la inhibición de la actividad enzimática.

11. En general, los derivados de cumarina correspondientes a las distintas series estudiadas no presentan efectos neurotóxicos sobre células de línea SH-SY5Y y/o cultivos primarios de neuronas de corteza motora de fetos de rata Wistar Kyoto.
12. En general, a excepción de los análogos híbridos curcumina-cumarina con sustituyente aminoacídico, las propiedades físico-químicas de los derivados correspondientes a las distintas series cumplen la regla de Lipinski, por lo que su paso a través de membranas celulares parece favorable. Sin embargo, la predicción teórica de paso a través de BHE, en muchos casos contradictoria con los estudios *in vitro*, resultó negativa para algunos de los derivados.
13. Los compuestos **MC151** y **MJM470** resultaron activos a dosis de 100 y 10 mg/Kg en la evaluación *in vivo* en ratones reserpinizados modelo farmacológico de EP, incrementando la distancia recorrida, la velocidad y el tiempo en movimiento.
14. El compuesto **MJM255** presentó un efecto similar al de la eserina en la evaluación *in vivo* en ratones modelo farmacológico de EA. La diferencia se aprecia en el periodo de latencia requerido para la aparición del efecto.
15. No ha sido posible determinar la biodisponibilidad de ninguno de los compuestos debido a que las concentraciones plasmáticas estaban en todos los casos por debajo de los límites de detección o cuantificación de los métodos desarrollados.





BIBLIOGRAFÍA



7. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's Dement.* 2013; 9(1): 63-75.e2.
- 2 Elbaz A, Carcaillon L, Kab S, Moisan F. Epidemiology of Parkinson's disease. *Rev Neurol (Paris).* 2016; 172(1): 14-26.
- 3 Dugger BN, Dickson DW. Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017; 9(7). pii: a028035.
- 4 Jellinger KA. General aspects of neurodegeneration. *J. Neural. Transm. Suppl.* 2003; 65: 101-44.
- 5 Bondi MW, Edmonds EC, Salmon DP. Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. *J Int Neuropsychol Soc.* 2017; 23(9-10): 818-31.
- 6 Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease. *Lancet.* 2015; 386(9996): 896-912.
- 7 Kolb HC, Andrés JI. Tau positron emission tomography imaging. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017; 9(5). pii: a023721.
- 8 Seeley WW. Mapping neurodegenerative disease onset and progression. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017; 9(8). pii: a023622.
- 9 Gao LB, Yu XF, Chen Q, Zhou D. Alzheimer's Disease therapeutics: current and future therapies. *Minerva Med.* 2016; 107(2): 108-13.
- 10 Cacabelos R. Parkinson's Disease: From Pathogenesis to Pharmacogenomics. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(3). pii: E551.
- 11 Dézsi L, Vécsei L. Monoamine Oxidase B Inhibitors in Parkinson's Disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2017; 16(4): 425-39.
- 12 Xu Y, Zhang J, Wang H, Mao F, Bao K, Liu W et al. Rational Design of Novel Selective Dual-Target Inhibitors of Acetylcholinesterase and Monoamine Oxidase B as Potential Anti-Alzheimer's Disease Agents. *ACS Chem Neurosci.* 2019; 10(1): 482-96.
- 13 Samadi A, de los Ríos C, Bolea I, Chioua M, Iriepa I, Moraleda I et al. Multipotent MAO and cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: synthesis, pharmacological analysis and molecular modeling of heterocyclic substituted alkyl and cycloalkyl propargyl amine. *Eur J Med Chem.* 2012; 52: 251-62.
- 14 Schapira AHV. Neurobiology and treatment of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 2009; 30: 41-7.
- 15 Wood-Kaczmar A, Gandhi S, Wood NW. Understanding the molecular causes of Parkinson's disease. *Trends Mol. Med.* 2006; 12: 521-8.
- 16 Kumar A, Singh A, Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol Rep.* 2015; 67(2): 195-203.
- 17 Brettschneider J, Del Tredici K, Lee VM, Trojanowski JQ. Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nat Rev Neurosci.* 2015; 16(2): 109-20.
- 18 Adler CH, Connor DJ, Hentz JG, Sabbagh MN, Caviness JN, Shill HA, et al. Incidental Lewy body disease: Clinical comparison to a control cohort. *Mov Disord.* 2010; 25 (5): 642-6.
- 19 Frigerio R, Fujishiro H, Ahn TB, Josephs KA, Maraganore DM, DelleDonne A, et al. Incidental Lewy body disease: Do some cases represent a preclinical stage of dementia with Lewy bodies? *Neurobiol Aging.* 2011; 32(5): 857-63.
- 20 Gibb WR, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1988; 51(6): 745-52.
- 21 Cavalli A, Bolognesi ML, Minarini A, Rosini M, Tumiatti V, Recanatini M, et al. Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases. *J. Med. Chem.* 2008; 51: 347-72.

- 22 Yáñez M, Viña D. Dual Inhibitors of monoamine oxidase and cholinesterase for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* 2013; 13: 1692-706.
- 23 Trippier PC, Jansen Labby K, Hawker DD, Mataka JJ, Silverman RB. Target- and mechanism-based therapeutics for neurodegenerative diseases: strength in numbers. *J Med Chem.* 2013; 56(8): 3121-47.
- 24 Stefanachi A, Leonetti F, Pisani L, Catto M, Carotti A. Coumarin: A Natural, Privileged and Versatile Scaffold for Bioactive Compounds. *Molecules.* 2018; 23(2). pii: E250.
- 25 Venugopala KN, Rashmi V, Odhav B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 963248.
- 26 Viña D, Matos MJ, Yáñez M, Santana L, Uriarte E. 3-Substituted coumarins as dual inhibitors of AChE and MAO for the treatment of Alzheimer's disease. *Med. Chem. Commun.* 2012; 3: 213-8.
- 27 Xia N, Daiber A, Förstermann U, Li H. Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol.* 2017; 174(12): 1633-46.
- 28 Orallo F. Comparative studies of the antioxidant effects of cis- and trans-resveratrol. *Curr Med Chem.* 2006; 13(1): 87-98.
- 29 Ahmed T, Javed S, Javed S, Tariq A, Šamec D, Tejada S, et al. Resveratrol and Alzheimer's Disease: Mechanistic Insights. *Mol Neurobiol.* 2017; 54(4): 2622-35.
- 30 Khurana S, Venkataraman K, Hollingsworth A, Piche M, Tai TC. Polyphenols: benefits to the cardiovascular system in health and in aging. *Nutrients.* 2013; 5(10): 3779-827.
- 31 Matos MJ, Viña D, Quezada E, Picciau C, Delogu G, Orallo F, et al. A new series of 3-phenylcoumarins as potent and selective MAO-B inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009; 19(12): 3268-70.
- 32 Nawaz W, Zhou Z, Deng S, Ma X, Ma X, Li C et al. Therapeutic Versatility of Resveratrol Derivatives. *Nutrients.* 2017; 9(11). pii: E1188.
- 33 Nelson KM, Dahlin JL, Bisson J, Graham J, Pauli GF, Walters MA. The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. *J Med Chem.* 2017; 60(5): 1620-37.
- 34 Tang M, Taghibiglou C. The Mechanisms of Action of Curcumin in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2017; 58(4): 1003-16.
- 35 Kunnumakkara AB, Bordoloi D, Padmavathi G, Monisha J, Roy NK, Prasad S, et al. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *Br J Pharmacol.* 2017; 174(11): 1325-48.
- 36 Kocaadam B, Şanlıer N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017; 57(13): 2889-95.
- 37 Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2002; 14(2): 223-36; discussion 222.
- 38 Parkinson's New Today [Internet]. Parkinson's Disease Statistics [Consultada Mayo de 2019]. Disponible en: <https://parkinsonsnewstoday.com/parkinsons-disease-statistics/>.
- 39 Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* 2007; 68: 384-86.
- 40 Alzheimer's Association. 2014 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2014; 10: e47-e92
- 41 Van Den Eeden SK. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol* 2003; 157: 1015-1022.
- 42 von Campenhausen S, Bornschein B, Wick R, Bötzel K, Sampaio C, Poewe W, et al. Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2005; 15 (4): 473-90.
- 43 Strickland D, Bertoni JM. Parkinson's prevalence estimated by a state registry. *Mov Disord.* 2004; 19: 318-23.
- 44 Bauso DJ, Tartari JP, Stefani CV, Rojas JI, Giunta DH, Cristiano E. Incidence and prevalence of Parkinson's disease in Buenos Aires City, Argentina. *Eur J Neurol.* 2012; 19: 1108-13.
- 45 Okubadejo NU, Bower JH, Rocca WA, Maraganore DM. Parkinson's disease in Africa: a systematic review of epidemiologic and genetic studies. *Mov Disord.* 2006; 21: 2150-56.

- 46 Muangpaisan W, Hori H, Brayne C. Systematic review of the prevalence and incidence of Parkinson's disease in Asia. *J Epidemiol.* 2009; 19: 281-93.
- 47 Benamer HTS, de Silva R, Siddiqui KA, Grosset DG. Parkinson's disease in Arabs: a systematic review. *Mov Disord.* 2008; 23: 1205-10.
- 48 Ferreira M, Massano J. An updated review of Parkinson's disease genetics and clinicopathological correlations. *Acta Neurol Scand.* 2017; 135(3): 273-84.
- 49 Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanism and models. *Neuron.* 2003; 39: 889-09.
- 50 Postuma RB, Aarsland D, Barone P, Burn DJ, Hawkes CH, Oertel W, et al. Identifying prodromal Parkinson's disease: pre-motor disorders in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2012; 27 (5): 617-26.
- 51 Noyce AJ, Bestwick JP, Silveira-Moriyama L, Hawkes CH, Giovannoni G, Lees AJ, et al. Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. *Ann Neurol.* 2012; 72(6): 893-901.
- 52 Driver JA, Logroscino G, Gaziano JM, Kurth T. Incidence and remaining lifetime risk of Parkinson disease in advanced age. *Neurology.* 2009; 72: 432-38.
- 53 Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TDL. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord.* 2014; 29: 1583-90.
- 54 Foubert-Samier A, Helmer C, Perez F, Le Goff M, Auriacombe S, Elbaz A, et al. Past exposure to neuroleptic drugs and risk of Parkinson disease in an elderly cohort. *Neurology.* 2012; 79(15): 1615-21.
- 55 Goldman SM, Quinlan PJ, Ross GW, Marras C, Meng C, Bhudhikanok GS, et al. Solvent exposures and Parkinson disease risk in twins. *Ann Neurol.* 2012; 71(6): 776-84.
- 56 Ritz B, Lee PC, Lassen CF, Arah OA. Parkinson disease and smoking revisited: ease of quitting is an early sign of the disease. *Neurology.* 2014; 83: 1396-402.
- 57 Campêlo CLDC, Silva RH. Genetic Variants in SNCA and the Risk of Sporadic Parkinson's Disease and Clinical Outcomes: A Review. *Parkinsons Dis.* 2017; 2017: 4318416.
- 58 Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276(5321): 2045-47.
- 59 Corti O, Lesage S, Brice A. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiol Rev.* 2011; 91: 1161-218.
- 60 Nalls MA, Pankratz N, Lill CM, Do CB, Hernandez DG, Saad M, et al. Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nat Genet* 2014; 46(9): 989-93.
- 61 Hornykiewicz O, Ehringer H. Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. *Klin. Wochenschr.* 1960; 38: 1236-9.
- 62 Lee VM, Trojanowski JQ. Mechanisms of Parkinson's disease linked to pathological alpha-synuclein: new targets for drug discovery. *Neuron.* 2006; 52: 33-8.
- 63 Goldstein DS. The catecholaldehyde hypothesis: where MAO fits in. *J Neural Transm (Vienna).* 2019 Dec 5. doi: 10.1007/s00702-019-02106-9. [Epub ahead of print]
- 64 Ammal Kaidery N1, Ahuja M1, Thomas B2. Crosstalk between Nrf2 signaling and mitochondrial function in Parkinson's disease. *Mol Cell Neurosci.* 2019 Dec;101:103413.
- 65 Birtwistle J, Baldwin D. Role of dopamine in schizophrenia and Parkinson's disease. *Br J Nurs.* 1998; 7(14): 832-4, 836, 838-41.
- 66 Panneton WM, Kumar VB, Gan Q, Burke WJ, Galvin JE. The neurotoxicity of DOPAL: behavioral and stereological evidence for its role in Parkinson disease pathogenesis. *PLoS One.* 2010; 5(12) :e15251.
- 67 Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch.* 2010; 460(2): 525-42.
- 68 Zhang S, Shao SY, Song XY, Xia CY, Yang YN, Zhang PC et al. Protective effects of Forsythia suspense extract with antioxidant and anti-inflammatory properties in a model of rotenone induced neurotoxicity. *Neurotoxicology.* 2016; 52: 72-83.

- 69 Marras C, Lang A. Parkinson's disease subtypes: lost in translation? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013; 84: 409-15.
- 70 Rang HP & Dale MM. *Farmacología*. Séptima edición. España: Elsevier; 2012
- 71 Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*. 1998; 78(1): 189-225.
- 72 Wood M, Dubois V, Scheller D, Gillard M. Rotigotine is a potent agonist at dopamine D1 receptors as well as at dopamine D2 and D3 receptors. *Br J Pharmacol*. 2015; 172(4): 1124-35.
- 73 Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev*. 2011; 63(1): 182-217.
- 74 Connolly B, Lang AE. Pharmacological treatment of Parkinson's disease: a review. *JAMA*. 2014; 311: 1670-83.
- 75 Lang AE, Marras C. Initiating dopaminergic treatment in Parkinson's disease. *Lancet*. 2014; 384: 1164-66.
- 76 Aldakheel A, Kalia LV, Lang AE. Pathogenesis-targeted, diseasemodifying therapies in Parkinson disease. *Neurother*. 2014; 11: 6-23.
- 77 Olanow CW. The scientific basis for the current treatment of Parkinson's disease. *Annu. Rev. Med*. 2004; 55: 41-60.
- 78 LeWitt PA. Levodopa therapy for Parkinson's disease: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Mov Disord*. 2015; 30(1): 64-72.
- 79 Montioli R, Voltattorni CB, Bertoldi M. Parkinson's Disease: Recent Updates in the Identification of Human Dopa Decarboxylase Inhibitors. *Curr Drug Metab*. 2016; 17(5): 513-8.
- 80 Lees AJ. Evidence-based efficacy comparison of tolcapone and entacapone as adjunctive therapy in Parkinson's disease. *CNS Neurosci Ther*. 2008; 14(1): 83-93.
- 81 Chang Y, Wang LB, Li D, Lei K, Liu SY. Efficacy of rasagiline for the treatment of Parkinson's disease: an updated meta-analysis. *Ann Med*. 2017; 49(5): 421-34.
- 82 Przuntek H, Conrad B, Dichgans J, Kraus PH, Krauseneck P, Pergande G. SELEDO: a 5-year long-term trial on the effect of selegiline in early Parkinsonian patients treated with levodopa. *Eur. J. Neurol*. 1999; 6: 141-50.
- 83 Filip V, Kolibás E. Selegiline in the treatment of Alzheimer's disease: a long-term randomized placebo-controlled trial. Czech and Slovak senile dementia of Alzheimer type study group. *J. Psychiatry Neurosci*. 1999; 24: 234-43.
- 84 Bar-Am O, Amit T, Youdim MB. Aminoindan and hydroxyaminoindan, metabolites of rasagiline and ladostigil, respectively, exert neuroprotective properties in vitro. *J. Neurochem*. 2007; 103: 500-8.
- 85 Bar-Am O, Amit T, Youdim MB. Contrasting neuro-protective and neurotoxic actions of respective metabolites of anti-Parkinson drugs rasagiline and selegiline. *Neurosci Lett*. 2004; 355: 169-72.
- 86 Youdim MB. Multi target neuroprotective and neurorestorative anti-Parkinson and anti-Alzheimer drugs ladostigil and M30 derived from rasagiline. *Exp Neurobiol*. 2013; 22(1): 1-10.
- 87 Suero-García C, Martín-Banderas L, Holgado MA. Efecto neuroprotector de los cannabinoides en las enfermedades neurodegenerativas. *Ars Pharm*. 2015; 56(2): 77-87.
- 88 Yarnall A, Rochester L, Burn DJ. The interplay of cholinergic function, attention, and falls in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2011; 26: 2496-503.
- 89 Emre M, Aarsland D, Albanese A, Byrne EJ, Deuschl G, De Deyn PP, et al. Rivastigmine for dementia associated with Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 2004; 351: 2509-18.
- 90 Seppi K, Weintraub D, Coelho M, Perez-Lloret S, Fox SH, Katzenschlager R, et al. The Movement Disorder Society evidence-based medicine review update: treatments for the non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2011; 26: S42-80.
- 91 Richard IH, McDermott MP, Kurlan R, Lyness JM, Como PG, Pearson N, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of antidepressants in Parkinson disease. *Neurology*. 2012; 78(16): 1229-36.

- 92 Barone P, Poewe W, Albrecht S, Debieuvre C, Massey D, Rascol O, et al. Pramipexole for the treatment of depressive symptoms in patients with Parkinson's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* 2010; 9: 573-80.
- 93 St Louis EK, Boeve BF. REM Sleep Behavior Disorder: Diagnosis, Clinical Implications, and Future Directions. *Mayo Clin Proc.* 2017; 92(11): 1723-36.
- 94 Stocchi F, Torti M. Constipation in Parkinson's Disease. *Int Rev Neurobiol.* 2017; 134: 811-26.
- 95 Tran HT, Chung CH, Iba M, Zhang B, Trojanowski JQ, Luk KC, et al. α -Synuclein immunotherapy blocks uptake and templated propagation of misfolded α -synuclein and neurodegeneration. *Cell Rep.* 2014; 7(6): 2054-65.
- 96 Coune PG, Schneider BL, Aebischer P. Parkinson's disease: gene therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012; 2: a009431.
- 97 Kordower JH, Bjorklund A. Trophic factor gene therapy for Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2013; 28: 96-109.
- 98 Bjorklund A, Kordower JH. Cell therapy for Parkinson's disease: what next? *Mov Disord.* 2013; 28: 110-15.
- 99 Lindvall O. Developing dopaminergic cell therapy for Parkinson's disease—give up or move forward? *Mov Disord.* 2013; 28: 268-73.
- 100 Kalia SK, Sankar T, Lozano AM. Deep brain stimulation for Parkinson's disease and other movement disorders. *Curr Opin Neurol.* 2013; 26: 374-80.
- 101 Lhommée E, Wojtecki L, Czernecki V, Witt K, Maier F, Tonder L et al. Behavioural outcomes of subthalamic stimulation and medical therapy versus medical therapy alone for Parkinson's disease with early motor complications (EARLYSTIM trial): secondary analysis of an open-label randomised trial. *Lancet Neurol.* 2018; 17(3): 223-31.
- 102 Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat.* 1995; 8: 429-31.
- 103 Wimo A, Winblad B, Aguero-Torres H, von Strauss E. The magnitude of dementia occurrence in the world. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2003; 17(2): 63-7.
- 104 Rabin LA, Wang C, Katz MJ, Derby CA, Buschke H, Lipton B. Predicting Alzheimer's disease: neuropsychological tests, self-reports, and information reports of cognitive difficulties. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2012; 60(6): 1128-34.
- 105 Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 1975; 12(3): 189-98.
- 106 Alzheimer. Instrumentos de evaluación [en línea]. Disponible en: <http://www.alzheimer.sld.cu/instrumentos-de-evaluacion> [Consultado el 1 de julio de 2016].
- 107 Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol.* 2018; 25(1): 59-70.
- 108 Bondi MW, Jak AJ, Delano-Wood L, Jacobson MW, Delis DC, Salmon DP. Neuropsychological contributions to the early identifications of Alzheimer's disease. *Neuropsychol. Rev.* 2008; 18: 73-90.
- 109 Dubois B, Hampel H, Feldman HH, Scheltens P, Aisen P, Andrieu S, et al. Preclinical Alzheimer's disease: definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimers Dement.* 2016; 12(3): 292-323.
- 110 Rebeck GW, Kindy M, LaDu MJ. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: The protective effects of ApoE2 and E3. *J Alzheimers Dis.* 2002; 4: 145-54.
- 111 Nixon RA. Amyloid precursor protein and endosomal-lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease: inseparable partners in a multifactorial disease. *FASEB J.* 2017; 31(7): 2729-2743.
- 112 Allsop D, Mayes J. Amyloid β -peptide and Alzheimer's disease. *Essays Biochem.* 2014; 56: 99-110.
- 113 Crous-Bou M, Minguillón C, Gramunt N, Molinuevo JL. Alzheimer's disease prevention: from risk factors to early intervention. *Alzheimers Res Ther.* 2017; 9(1): 71.
- 114 Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, et al. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid

- precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(7): 4162-7.
- 115 Nameni G, Farhangi MA, Hajiluian G, Shahabi P, Abbasi MM. Insulin deficiency: a possible link between obesity and cognitive function. *Int J Dev Neurosci*. 2017; 59: 15-20.
- 116 Warnert EA, Rodrigues JC, Burchell AE, Neumann S, Ratcliffe LE, Manghat NE, et al. Is high blood pressure self-protection for the brain? *Circ Res*. 2016; 119(12): e140–e151.
- 117 Love S, Miners JS. Cerebral hypoperfusion and the energy deficit in Alzheimer's disease. *Brain Pathol*. 2016; 26(5): 607-17.
- 118 Barnes DE, Yaffe K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol*. 2011; 10(9): 819-28.
- 119 Durazzo TC, Mattsson N, Weiner MW. Smoking and increased Alzheimer's disease risk: a review of potential mechanisms. *Alzheimers Dement*. 2014; 10(3 Suppl): S122-45.
- 120 Rolland Y, Abellan van Kan G, Vellas B. Physical activity and Alzheimer's disease: from prevention to therapeutic perspectives. *J Am Med Dir Assoc*. 2008; 9(6): 390-405.
- 121 Vos SJB, van Boxtel MPJ, Schiepers OJG, Deckers K, de Vugt M, Carrière I, et al. Modifiable risk factors for prevention of dementia in midlife, late life and the oldest-old: validation of the LIBRA Index. *J Alzheimers Dis*. 2017; 58(2): 537-47.
- 122 Valls-Pedret C, Sala-Vila A, Serra-Mir M, Corella D, de la Torre R, Martínez-González MÁ, et al. Mediterranean diet and age-related cognitive decline: a randomized clinical trial. *JAMA Intern Med*. 2015; 175(7): 1094-103.
- 123 Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Estruch R, Corella D, Fitó M, Ros E, et al. Benefits of the Mediterranean Diet: Insights From the PREDIMED Study. *Prog Cardiovasc Dis*. 2015; 58(1): 50-60.
- 124 Scarmeas N, Stern Y, Tang MX, Mayeux R, Luchsinger JA. Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 2006; 59(6): 912-21.
- 125 Sultzer D, Brown CV, Mandelkern MA, Mahler ME, Mendez MF, Chen ST, et al. Delusional thoughts and regional frontal/temporal cortex metabolism in Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry*. 2003; 160(2): 341-9.
- 126 Giacobini E, Gold G. Alzheimer disease therapy—moving from amyloid-beta to tau. *Nat Rev Neurol*. 2013; 9(12): 677-86.
- 127 Deane R, Wu Z, Zlokovic BV. RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood–brain barrier. *Stroke*. 2004; 35(11 Suppl 1): 2628-31.
- 128 Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002; 297(5580): 353-6.
- 129 Walsh DM, Selkoe DJ. A β oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem*. 2007; 101(5): 1172-84.
- 130 Kumar A, Dogra S. Neuropathology and therapeutic management of Alzheimer's disease –an update. *Drugs Future*. 2008; 33: 433-46.
- 131 McGeer PL, Itagaki S, Tago H, McGeer EG. Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR. *Neurosci Lett*. 1987; 79(1-2): 195-200.
- 132 Thal DR. The role of astrocytes in amyloid β -protein toxicity and clearance. *Exp Neurol*. 2012; 236(1): 1-5.
- 133 Lichtenthaler SF, Haass C, Steiner H. Regulated intramembrane proteolysis - Lessons from amyloid precursor protein processing. *J Neurochem*. 2011; 117(5): 779-96.
- 134 Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 1992; 256(5054): 184-5.
- 135 Hardy J. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis: an update and reappraisal. *J Alzheimers Dis*. 2006; 9(3) (Suppl.): 151-3.
- 136 Iqbal K, Liu F, Gong C-X, Alonso AdelC, Grundke-Iqbal I. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol*. 2009; 118(1): 53-69.

- 137 Wang B, Wang Z, Sun L, Yang L, Li H, Cole AL, et al. The amyloid precursor protein controls adult hippocampal neurogenesis through GABAergic interneurons. *J Neurosci*. 2014; 34(40): 13314-25.
- 138 Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2007; 8(9): 663-72.
- 139 Iqbal K, Alonso Adel C, El-Akkad E, Gong CX, Haque N, Khatoon S et al. Alzheimer neurofibrillary degeneration: therapeutic targets and high-throughput assays. *J Mol Neurosci*. 2003; 20(3): 425-9.
- 140 Fang C, Gu L, Smerin D, Mao S, Xiong X. The Interrelation between Reactive Oxygen Species and Autophagy in Neurological Disorders. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017: 8495160.
- 141 Romano AD, Serviddio G, de Matthaeis A, Bellanti F, Vendemiale G. Oxidative stress and aging. *J Nephrol*. 2010;23 (Suppl. 15): S29-36.
- 142 Tabner BJ, El-Agnaf OM, Turnbull S, German MJ, Paleologou KE, Hayashi Y, et al. Hydrogen peroxide is generated during the very early stages of aggregation of the amyloid peptides implicated in Alzheimer disease and familial British dementia. *J Biol Chem*. 2005; 280(43): 35789-92.
- 143 Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*. 2010; 140(6): 918-34.
- 144 Mizuno T. The biphasic role of microglia in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis*. 2012; 2012: 737846.
- 145 Firuzi O, Praticò D. Coxibs and Alzheimer's disease: should they stay or should they go? *Ann Neurol*. 2006; 59(2): 219-28.
- 146 Lee CY, Landreth GE. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J Neural Transm (Vienna)*. 2010; 117(8): 949-60.
- 147 Pithadia AS, Lim MH. Metal-associated amyloid- β species in Alzheimer's disease. *Curr Opin Chem Biol*. 2012; 16(1-2): 67-73.
- 148 Solomonov I, Korkotian E, Born B, Feldman Y, Bitler A, Rahimi F, et al. Zn²⁺-A β 40 complexes form metastable quasi-spherical oligomers that are cytotoxic to cultured hippocampal neurons. *J Biol Chem*. 2012; 287(24): 20555-64.
- 149 Savelieff MG, Lee S, Liu Y, Lim MH. Untangling amyloid- β , tau, and metals in Alzheimer's disease. *ACS Chem Biol*. 2013; 8(5): 856-65.
- 150 Hogervorst E, Williams J, Budge M, Barnetson L, Combrinck M, Smith AD. Serum total testosterone is lower in men with Alzheimer's disease. *Neuroendocrinol Lett*. 2001; 22(3): 163-8.
- 151 Gouras GK, Xu H, Gross RS, Greenfield JP, Hai B, Wang R, et al. Testosterone reduces neuronal secretion of Alzheimer's beta-amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97(3): 1202-5.
- 152 Brinton RD. Impact of estrogen therapy on Alzheimer's disease: a fork in the road? *CNS Drugs*. 2004; 18(7): 405-22.
- 153 Rosario ER, Chang L, Head EH, Stanczyk FZ, Pike CJ. Brain levels of sex steroid hormones in men and women during normal aging and in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2011; 32(4): 604-13.
- 154 Kandiah N, Pai MC, Senanarong V, Looi I, Ampil E, Park KW, et al. Rivastigmine: the advantages of dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and its role in subcortical vascular dementia and Parkinson's disease dementia. *Clin Interv Aging*. 2017; 12: 697-707.
- 155 Nazarali AJ, Reynolds GP. Monoamine neurotransmitters and their metabolites in brain regions in Alzheimer's disease: a postmortem study. *Cell Mol Neurobiol*. 1992; 12(6): 581-7.
- 156 Rodríguez JJ, Noristani HN, Verkhatsky A. The serotonergic system in ageing and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*. 2012; 99(1): 15-41.
- 157 Jeltsch-David H, Koenig J, Cassel JC. Modulation of cholinergic functions by serotonin and possible implications in memory: general data and focus on 5-HT(1A) receptors of the medial septum. *Behav Brain Res*. 2008; 195(1): 86-97.

- 158 Dringenberg HC. Alzheimer's disease: more than a 'cholinergic disorder' - evidence that cholinergicmonoaminergic interactions contribute to EEG slowing and dementia. *Behav Brain Res.* 2000; 115(2): 235-49.
- 159 Olvera-Cortés ME, Anguiano-Rodríguez P, López-Vázquez MA, Alfaro JM. Serotonin/dopamine interaction in learning. *Prog Brain Res.* 2008; 172: 567-602.
- 160 Peddie CJ, Davies HA, Colyer FM, Stewart MG, Rodríguez JJ. Dendritic colocalisation of serotonin1B receptors and the glutamate NMDA receptor subunit NR1 within the hippocampal dentate gyrus: an ultrastructural study. *J Chem Neuroanat.* 2008; 36(1): 17-26.
- 161 Burke WJ, Chung HD, Huang JS, Huang SS, Haring JH, Strong R, et al. Evidence for retrograde degeneration of epinephrine neurons in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 1988; 24(4): 532-6.
- 162 Storga D, Vrecko K, Birkmayer JG, Reibnegger G. Monoaminergic neurotransmitters, their precursors and metabolites in brains of Alzheimer patients. *Neurosci Lett.* 1996; 203(1): 29-32.
- 163 Tohgi H, Ueno M, Abe T, Takahashi S, Nozaki Y. Concentrations of monoamines and their metabolites in the cerebrospinal fluid from patients with senile dementia of the Alzheimer type and vascular dementia of the Binswanger type. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect.* 1992; 4(1): 69-77.
- 164 Reinikainen KJ, Paljärvi L, Huuskonen M, Soininen H, Laakso M, Riekkinen PJ. A post-mortem study of noradrenergic, serotonergic and GABAergic neurons in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 1988; 84(1): 101-16.
- 165 Panula P, Yang HY, Costa E. Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984; 81(8): 2572-6.
- 166 Rahman A. The role of adenosine in Alzheimer's disease. *Curr Neuroparmacol.* 2009; 7(3): 207-16.
- 167 Kalara RN, Sromek S, Wilcox BJ, Unnerstall JR. Hippocampal adenosine A1 receptors are decreased in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 1990; 118(2): 257-60.
- 168 Greig NH, Utsuki T, Yu Q, Zhu X, Holloway HW, Perry T, et al. A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase. *Curr Med Res Opin.* 2001;17(3): 159-65.
- 169 Lane RM, Potkin SG, Enz A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2006; 9(1): 101-24.
- 170 Waite LM. Treatment for Alzheimer's disease: has anything changed? *Aust Prescr.* 2015; 38(2): 60-3.
- 171 Geldmacher DS. Treatment guidelines for Alzheimer's disease: redefining perceptions in primary care. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry.* 2007; 9(2): 113-21.
- 172 Kishi T, Matsunaga S, Oya K, Nomura I, Ikuta T, Iwata N. Memantine for Alzheimer's Disease: An Updated Systematic Review and Meta-analysis. *J Alzheimers Dis.* 2017; 60(2): 401-25.
- 173 Gil-Neciga E, Gobart AL. Treatment pattern of Alzheimer's disease with cholinesterase inhibitors (TRAIN study) (Artículo en español). *Rev. Neurol.* 2008; 46(8): 461-4.
- 174 Bond M, Rogers G, Peters J, Anderson R, Hoyle M, Miners A et al. The effectiveness and cost-effectiveness of donepezil, galantamine, rivastigmine and memantine for the treatment of Alzheimer's disease (review of Technology Appraisal No. 111): a systematic review and economic model. *Health Technol Assess.* 2012; 16(21): 1-470.
- 175 Umar T, Hoda N. Alzheimer's Disease: A Systemic Review of Substantial Therapeutic Targets and the Leading Multi-functional Molecules. *Curr Top Med Chem.* 2017; 17(31): 3370-89.
- 176 Wang H, Jiang T, Li W, Gao N, Zhang T. Resveratrol attenuates oxidative damage through activating mitophagy in an in vitro model of Alzheimer's disease. *Toxicol Lett.* 2018; 282: 100-08.
- 177 Suzuki K, Iwata A, Iwatsubo T. The past, present, and future of disease-modifying therapies for Alzheimer's disease. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2017; 93(10): 757-71.

- 178 Briggs R, Kennelly SP, O'Neill D. Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clin Med (Lond)*. 2016; 16(3): 247-53.
- 179 Wischik CM, Staff RT, Wischik DJ, Bentham P, Murray AD, Storey JM et al. Tau aggregation inhibitor therapy: an exploratory phase 2 study in mild or moderate Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2015; 44(2): 705-20.
- 180 Kontsekova E, Zilka N, Kovacech B, Novak P, Novak M. First-in-man tau vaccine targeting structural determinants essential for pathological tau-tau interaction reduces tau oligomerisation and neurofibrillary degeneration in an Alzheimer's disease model. *Alzheimers Res Ther*. 2014; 6(4): 44.
- 181 Salloway S, Sperling R, Fox NC, Blennow K, Klunk W, Raskind M et al. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2014 Jan 23; 370(4): 322-33.
- 182 Loera-Valencia R, Piras A, Ismail MAM, Manchanda S, Eyjolfssdottir H, Saido TC et al. Targeting Alzheimer's disease with gene and cell therapies. *J Intern Med*. 2018; 284(1): 2-36.
- 183 Venugopala KN, Rashmi V, Odhav B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *Biomed Res Int*. 2013; 2013: 963248.
- 184 Vogel A. Darstellung von Benzoesäure aus der Tonka-Bohne und aus den Meliloten - oder Steinklee - Blumen. *Ann Phys*. 1820; 64(2): 161-6.
- 185 Choi J, Lee KT, Ka H, Jung WT, Jung HJ, Park HJ. Constituents of the essential oil of the *Cinnamomum cassia* stem bark and the biological properties. *Arch Pharm Res*. 2001; 24(5): 418-23.
- 186 Bourgaud F, Hehn A, Larbat R, Doerper S, Gontier E, Kellner S, et al. Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochem Rev*. 2006; 5: 293-308.
- 187 Tanaka Y, Fujii W, Hori H, Kitagawa Y, Ozaki K. Relationship between coumarin-induced hepatocellular toxicity and mitochondrial function in rats. *Food Chem. Toxicol*. 2016; 90: 1-9.
- 188 Ratanasavanh D, Lamiable D, Biour M, Guédès Y, Gersberg M, Leutenegger E, et al. Metabolism and toxicity of coumarin on cultured human, rat, mouse and rabbit hepatocytes. *Fundam Clin Pharmacol*. 1996; 10(6): 504-10.
- 189 Stefanachi A, Leonetti F, Pisani L, Catto M, Carotti A. Coumarin: A Natural, Privileged and Versatile Scaffold for Bioactive Compounds. *Molecules*. 2018; 23(2): pii: E250.
- 190 Hu Y, Shen Y, Wu X, Tu X, Wang GX. Synthesis and biological evaluation of coumarin derivatives containing imidazole skeleton as potential antibacterial agents. *Eur J Med Chem*. 2018; 143: 958-69.
- 191 Hu XL, Xu Z, Liu ML, Feng LS, Zhang GD. Recent Developments of Coumarin Hybrids as Anti-fungal Agents. *Curr Top Med Chem*. 2017; 17(29): 3219-31.
- 192 Hassan MZ, Osman H, Ali MA, Ahsan MJ. Therapeutic potential of coumarins as antiviral agents. *Eur J Med Chem*. 2016; 123: 236-55.
- 193 Matsumoto T, Takahashi K, Kanayama S, Nakano Y, Imai H, Kibi M, et al. Structures of antimutagenic constituents in the peels of *Citrus limon*. *J Nat Med*. 2017; 71(4): 735-44.
- 194 Bubols GB, Vianna Dda R, Medina-Remon A, von Poser G, Lamuela-Raventos RM, Eifler-Lima VL, et al. The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. *Mini Rev Med Chem*. 2013; 13(3): 318-34.
- 195 Salar U, Khan KM, Jabeen A, Faheem A, Naqvi F, Ahmed S, et al. ROS Inhibitory Activity and Cytotoxicity Evaluation of Benzoyl, Acetyl, Alkyl Ester, and Sulfonate Ester Substituted Coumarin Derivatives. *Med Chem*. 2019; [Epub pendiente de publicación]
- 196 Thomas V, Giles D, Basavarajaswamy GPM, Das AK, Patel A. Coumarin Derivatives as Anti-inflammatory and Anticancer Agents. *Anticancer Agents Med Chem*. 2017; 17(3): 415-23.
- 197 Kasperkiewicz K, Ponczek MB, Budzisz E. A biological, fluorescence and computational examination of synthetic coumarin derivatives with antithrombotic potential. *Pharmacol Rep*. 2018; 70(6): 1057-64.

- 198 Gómez-Outes A, Suárez-Gea ML, Calvo-Rojas G, Lecumberri R, Rocha E, Pozo-Hernández C, et al. Discovery of anticoagulant drugs: a historical perspective. *Curr Drug Discov Technol.* 2012; 9(2): 83-104.
- 199 Wang C, Li Y, Zhang T, Wei D, Hou Y, He H. 5-Phenylcoumarin Derivatives: Design, Synthesis, and Vasodilatory Activity. *Chem Biodivers.* 2018; 15(11): e1800255.
- 200 Skalicka-Woźniak K, Orhan IE, Cordell GA, Nabavi SM, Budzyńska B. Implication of coumarins towards central nervous system disorders. *Pharmacol Res.* 2016; 103: 188-203.
- 201 Jameel E, Umar T, Kumar J, Hoda N. Coumarin: A Privileged Scaffold for the Design and Development of Antineurodegenerative Agents. *Chem Biol Drug Des.* 2016; 87(1): 21-38.
- 202 Matos MJ, Rodríguez-Enríquez F, Vilar S, Santana L, Uriarte E, Hripcsak G, et al. Potent and selective MAO-B inhibitory activity: amino- versus nitro-3-aryl coumarin derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* 2015; 25(3): 642-8.
- 203 Sonmez F, Zengin Kurt B, Gazioglu I, Basile L, Dag A, Cappello V, et al. Design, synthesis and docking study of novel coumarin ligands as potential selective acetylcholinesterase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2017; 32(1): 285-97.
- 204 Srivastava P, Vyas VK, Variya B, Patel P, Qureshi G, Ghate M. Synthesis, anti-inflammatory, analgesic, 5-lipoxygenase (5-LOX) inhibition activities, and molecular docking study of 7-substituted coumarin derivatives. *Bioorg Chem.* 2016; 67: 130-8.
- 205 Shen FQ, Wang ZC, Wu SY, Ren SZ, Man RJ, Wang BZ, et al. Synthesis of novel hybrids of pyrazole and coumarin as dual inhibitors of COX-2 and 5-LOX. *Bioorg Med Chem Lett.* 2017; 27(16): 3653-60.
- 206 von Werder F. Derivatives of 3-coumarincarboxylic acid, a new class of synthetic medicinal. *Merck's Jahresber.* 1936; 50: 88-101.
- 207 Bose PK. Biochemical properties of natural coumarins. *J Indian Chem Soc.* 1958; 35: 367-75.
- 208 Soine TO. Naturally Occurring Coumarins and related Physiological Activities. *J Pharm Sci.* 1964; 53: 231-64.
- 209 Niu H, Wang W, Li J, Lei Y, Zhao Y, Yang W, et al. A novel structural class of coumarin-chalcone fibrates as PPAR α/γ agonists with potent antioxidant activities: Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking studies. *Eur J Med Chem.* 2017; 138: 212-20.
- 210 Torres FC, Brucker N, Andrade SF, Kawano DF, Garcia SC, Poser GL, et al. New insights into the chemistry and antioxidant activity of coumarins. *Curr Top Med Chem.* 2014; 14(22): 2600-23.
- 211 Filipský T, Říha M, Macáková K, Anzenbacherová E, Karlíčková J, Mladěnka P. Antioxidant effects of coumarins include direct radical scavenging, metal chelation and inhibition of ROS-producing enzymes. *Curr Top Med Chem.* 2015; 15(5): 415-31.
- 212 Pérez-Cruz F, Vazquez-Rodriguez S, Matos MJ, Herrera-Morales A, Villamena FA, Das A, et al. Synthesis and electrochemical and biological studies of novel coumarin-chalcone hybrid compounds. *J Med Chem.* 2013; 56(15): 6136-45.
- 213 Xi GL, Liu ZQ. Coumarin-fused coumarin: antioxidant story from N,N-dimethylamino and hydroxyl groups. *J Agric Food Chem.* 2015; 63(13): 3516-23.
- 214 Nagamallu R, Srinivasan B, Ningappa MB, Kariyappa AK. Synthesis of novel coumarin appended bis(formylpyrazole) derivatives: Studies on their antimicrobial and antioxidant activities. *Bioorg Med Chem Lett.* 2016; 26(2): 690-4.
- 215 Kirsch G, Abdelwahab AB, Chaimbault P. Natural and Synthetic Coumarins with Effects on Inflammation. *Molecules.* 2016; 21(10): pii: E1322.
- 216 Melagraki G, Afantitis A, Igglezzi-Markopoulou O, Detsi A, Koufaki M, Kontogiorgis C, et al. Synthesis and evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory activity of novel coumarin-3-aminoamides and their alpha-lipoic acid adducts. *Eur J Med Chem.* 2009; 44: 3020-6.
- 217 Kang SW, Kim CY, Song DG, Pan CH, Cha KH, Lee DU, et al. Rapid identification of furanocoumarins in *Angelica dahurica* using the online LC-MMR-MS and their nitric oxide inhibitory activity in RAW 264.7 cells. *Phytochem Anal.* 2010; 21(4): 322-7.

- 218 Huang GJ, Deng JS, Liao JC, Hou WC, Wang SY, Sung PJ, et al. Inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 participate in anti-inflammatory activity of imperatorin from *Glehnia littoralis*. *J Agric Food Chem*. 2012; 60(7): 1673-81.
- 219 Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1962; 111: 544-7.
- 220 Sun J, Chi G, Soromou LW, Chen N, Guan M, Wu Q, et al. Preventive effect of Imperatorin on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. *Int Immunopharmacol*. 2012; 14(4): 369-74.
- 221 Lin CL, Hsiao G, Wang CC, Lee YL. Imperatorin exerts antiallergic effects in Th2-mediated allergic asthma via induction of IL-10-producing regulatory T cells by modulating the function of dendritic cells. *Pharmacol Res*. 2016; 110: 111-21.
- 222 Moon TC, Jin M, Son JK, Chang HW. The effects of isoimperatorin isolated from *Angelica dahuricae* on cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase in mouse bone marrow-derived mast cells. *Arch Pharm Res*. 2008; 31 (2): 210-5.
- 223 Wang CC, Lai JE, Chen LG, Yen KY, Yang LL. Inducible nitric oxide synthase inhibitors of Chinese herbs. Part 2: naturally occurring furanocoumarins. *Bioorg Med Chem*. 2000; 8(12): 2701-7.
- 224 Lima V, Silva CB, Mafezoli J, Bezerra MM, Moraes MO, Mourão GS, et al. Antinociceptive activity of the pyranocoumarin seselin in mice. *Fitoterapia*. 2006; 77(7-8): 574-8.
- 225 Khan S, Shehzad O, Cheng MS, Li RJ, Kim YS. Pharmacological mechanism underlying anti-inflammatory properties of two structurally divergent coumarins through the inhibition of pro-inflammatory enzymes and cytokines. *J Inflamm (Lond)*. 2015; 12: 47.
- 226 Ishita IJ, Nurul Islam M, Kim YS, Choi RJ, Sohn HS, Jung HA, et al. Coumarins from *Angelica decursiva* inhibit lipopolysaccharide-induced nitrite oxide production in RAW 264.7 cells. *Arch Pharm Res*. 2016; 39(1): 115-26.
- 227 Kohno S, Murata T, Sugiura A, Ito C, Iranshahi M, Hikita K, et al. Methyl galbanate, a novel inhibitor of nitric oxide production in mouse macrophage RAW264.7 cells. *J Nat Med*. 201; 65(2): 353-9.
- 228 Lee J, Lee YJ, Kim J, Bang OS. Pyranocoumarins from Root Extracts of *Peucedanum praeruptorum* Dunn with Multidrug Resistance Reversal and Anti-Inflammatory Activities. *Molecules*. 2015; 20(12): 20967-78.
- 229 Chun J, Tosun A, Kim YS. Anti-inflammatory effect of corymbocoumarin from *Seseli gummiferum* subsp. *corymbosum* through suppression of NF- κ B signaling pathway and induction of HO-1 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Int Immunopharmacol*. 2016; 31: 207-15.
- 230 Yang SM, Chan YL, Hua KF, Chang JM, Chen HL, Tsai YJ, et al. Osthole improves an accelerated focal segmental glomerulosclerosis model in the early stage by activating the Nrf2 antioxidant pathway and subsequently inhibiting NF- κ B-mediated COX-2 expression and apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2014; 73: 260-9.
- 231 Matos MJ, Rodríguez-Enríquez F, Borges F, Santana L, Uriarte E, Estrada M, et al. 3-Amidocoumarins as Potential Multifunctional Agents against Neurodegenerative Diseases. *ChemMedChem*. 2015; 10(12): 2071-9.
- 232 Yun BS, Lee IK, Ryoo IJ, Yoo ID. Coumarins with monoamine oxidase inhibitory activity and antioxidative coumarino-lignans from *Hibiscus syriacus*. *J Nat Prod*. 2001; 64: 1238-40.
- 233 Hossain CF, Okuyama E, Yamazaki M. A new series of coumarin derivatives having monoamine oxidase inhibitory activity from *Monascus anka*. *Chem Pharm Bull*. 1996; 44: 1535-9.
- 234 Chimichi S, Boccalini M, Salvador A, Dall'Acqua F, Basso G, Viola G. Synthesis and biological evaluation of new geiparvarin derivatives. *ChemMedChem*. 2009; 4(5): 769-79.
- 235 Delogu GL, Serra S, Quezada E, Uriarte E, Vilar S, Tatonetti NP, et al. Monoamine oxidase (MAO) inhibitory activity: 3-phenylcoumarins versus 4-hydroxy-3-phenylcoumarins. *ChemMedChem*. 2014; 9(8): 1672-6.

- 236 Matos MJ, Viña D, Vázquez-Rodríguez S, Uriarte E, Santana L. Focusing on new monoamine oxidase inhibitors: Differently Substituted Coumarins as an interesting scaffold. *Curr Top Med Chem*. 2012; 12: 2210-39.
- 237 Matos MJ, Viña D, Picciau C, Orallo F, Santana L, Uriarte E. Synthesis and evaluation of 6-methyl-3-phenylcoumarins as potent and selective MAO-B inhibitors. *Bioorg Med Chem. Lett*. 2009; 19: 5153-5.
- 238 Matos MJ, Vázquez-Rodríguez S, Uriarte E, Santana L, Viña D. MAO inhibitory activity modulation: 3-phenylcoumarins versus 3-benzoylcoumarins. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011; 21: 4224-7.
- 239 Viña D, Matos MJ, Ferino G, Cadoni E, Laguna R, Borges F, et al. 8-Substituted 3-aryl coumarins as potent and selective MAO-B inhibitors: synthesis, pharmacological evaluation, and docking studies. *Med Chem Commun*. 2012; 7: 464-70.
- 240 Costas-Lago MC, Besada P, Rodríguez-Enríquez F, Viña D, Vilar S, Uriarte E, et al. Synthesis and structure-activity relationship study of novel 3-heteroaryl coumarins based on pyridazine scaffold as selective MAO-B inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2017; 139: 1-11.
- 241 Rollinger JM1, Hornick A, Langer T, Stuppner H, Prast H. Acetylcholinesterase inhibitory activity of scopolin and scopoletin discovered by virtual screening of natural products. *J Med Chem*. 2004; 47(25): 6248-54.
- 242 Ozek G, Yur S, Goger F, Ozek T, Andjelkovic B, Godjevac D et al. Furanocoumarin Content, Antioxidant Activity, and Inhibitory Potential of *Heracleum verticillatum*, *Heracleum sibiricum*, *Heracleum angustisectum*, and *Heracleum ternatum* Extracts against Enzymes Involved in Alzheimer's Disease and Type II Diabetes. *Chem Biodivers*. 2019; 16(4): e1800672.
- 243 Feng B, Li X, Xia J, Wu S. Discovery of novel isoflavone derivatives as AChE/BuChE dual-targeted inhibitors: synthesis, biological evaluation and molecular modelling. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2017; 32(1): 968-77.
- 244 Ichikawa M, Ichibagase H. Studies on synthesis of coumarin derivatives. XX. Synthesis and antibacterial activity of derivatives of N-substituted 3-coumarincarboxamide. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1968; 16(11): 2093-100.
- 245 Khunnawutmanotham N, Laongthipparos C, Saparpakorn P, Chimnoi N, Techasakul S. Synthesis of 3-aminocoumarin-N-benzylpyridinium conjugates with nanomolar inhibitory activity against acetylcholinesterase. *Beilstein J Org Chem*. 2018; 14: 2545-52.
- 246 Asadipour A, Alipour M, Jafari M, Khoobi M, Emami S, Nadri H et al. Novel coumarin-3-carboxamides bearing N-benzylpiperidine moiety as potent acetylcholinesterase inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2013; 70: 623-30.
- 247 Yan R, Vassar R. Targeting the β secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *Lancet Neurol*. 2014; 13(3): 319-29.
- 248 Marumoto S, Miyazawa M. beta-secretase inhibitory effects of furanocoumarins from the root of *Angelica dahurica*. *Phytother Res*. 2010; 24(4): 510-3.
- 249 Marumoto S, Miyazawa M. Structure-activity relationships for naturally occurring coumarins as β -secretase inhibitor. *Bioorg Med Chem*. 2012; 20(2): 784-8.
- 250 Garino C, Pietrancosta N, Laras Y, Moret V, Rolland A, Quéléver G. BACE-1 inhibitory activities of new substituted phenyl-piperazine coupled to various heterocycles: Chromene, coumarin and quinoline. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006; 16: 1995-9.
- 251 García-Meijide JA, Gómez-Reino JJ. The physiopathology of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Revista Española de Reumatología*. 2000; 27 (1): 33-5.
- 252 Hoozemans JJ, O'Banion MK. The role of COX-1 and COX-2 in Alzheimer's disease pathology and the therapeutic potentials of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2005; 4(3): 307-15.
- 253 Kathuria A, Priya N, Chand K, Singh P, Gupta A, Jalal S, et al. Substrate specificity of acetoxy derivatives of coumarins and quinolones towards Calreticulin mediated transacetylation: investigations on antiplatelet function. *Bioorg Med Chem*. 2012; 20(4): 1624-38.

- 254 Kontogiorgis CA, Savvoglou K, Hadjipavlou-Litina DJ. Antiinflammatory and antioxidant evaluation of novel coumarin derivatives. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2006; 21(1): 21-9.
- 255 Kontogiorgis CA, Hadjipavlou-Litina DJ. Synthesis and antiinflammatory activity of coumarin derivatives. *J Med Chem*. 2005; 48(20): 6400-8.
- 256 Yoo SW, Kim JS, Kang SS, Son KH, Chang HW, Kim HP et al. Constituents of the fruits and leaves of *Euodia daniellii*. *Arch Pharm Res*. 2002; 25(6): 824-30
- 257 Rim HK, Cho W, Sung SH, Lee KT. Nodakenin suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in macrophage cells by inhibiting tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 and nuclear factor- κ B pathways and protects mice from lethal endotoxin shock. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012; 342(3): 654-64.
- 258 Jang HL, El-Gamal MI, Choi HE, Choi HY, Lee KT, Oh CH. Synthesis of tricyclic fused coumarin sulfonates and their inhibitory effects on LPS-induced nitric oxide and PGE2 productions in RAW 264.7 macrophages. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014; 24(2): 571-5.
- 259 Grover J, Kumar V, Sobhia ME, Jachak SM. Synthesis, biological evaluation and docking analysis of 3-methyl-1-phenylchromeno[4,3-c]pyrazol-4(1H)-ones as potential cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014; 24(19): 4638-42.
- 260 Rayar AM, Lagarde N, Martin F, Blanchard F, Liagre B, Ferroud C, et al. New selective cyclooxygenase-2 inhibitors from cyclocoumarol: Synthesis, characterization, biological evaluation and molecular modeling. *Eur J Med Chem*. 2018; 146: 577-87.
- 261 Theodosios-Nobelos P, Kourti M, Tziona P, Kourounakis PN, Rekka EA. Esters of some non-steroidal anti-inflammatory drugs with cinnamyl alcohol are potent lipoxygenase inhibitors with enhanced anti-inflammatory activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015; 25(22): 5028-31.
- 262 Roy A, Yang J, Zhang Y. COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40(Web Server issue): W471-7.
- 263 Srivastava P, Vyas VK, Variya B, Patel P, Qureshi G, Ghate M. Synthesis, anti-inflammatory, analgesic, 5-lipoxygenase (5-LOX) inhibition activities, and molecular docking study of 7-substituted coumarin derivatives. *Bioorg Chem*. 2016: 130-8.
- 264 Viña D, Matos MJ, Yáñez, M, Santana L, Uriarte E. 3-Substituted coumarins as dual inhibitors of AChE and MAO for the treatment of Alzheimer's disease. *Med Chem Commun*. 2011; 3: 213-8.
- 265 Brühlmann C, Ooms F, Carrupt PA, Testa B, Catto M, Leonetti F, et al. Coumarin derivatives as dual inhibitors of acetylcholinesterase and monoamine oxidase. *J Med Chem*. 2001; 44(19): 3195-8.
- 266 Farina R, Pisani L, Catto M, Nicolotti O, Gadaleta D, Denora N, et al. Structure-based design and optimization of multitarget-directed 2H-chromen-2-one derivatives as potent inhibitors of monoamine oxidase B and cholinesterases. *J Med Chem*. 2015; 58(14): 5561-78.
- 267 Piazza L, Rampa A, Bisi A, Gobbi S, Belluti F, Cavalli A, et al. 3-(4-[Benzyl(methyl)amino]methyl)phenyl)-6,7-dimethoxy-2H-chromenone (AP2238) inhibits both acetylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced beta-amyloid aggregation: a dual function lead for Alzheimer's disease therapy. *J Med Chem*. 2003; 46: 2279-82.
- 268 Tarozzi A, Bartolini M, Piazza L, Valgimigli L, Amorati R, Bolondi C, et al. From the dual function lead AP2238 to AP2469, a multi-target-directed ligand for the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacol Res Perspect*. 2014; 2(2): e00023.
- 269 Xie SS, Lan JS, Wang X, Wang ZM, Jiang N, Li F, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel donepezil-coumarin hybrids as multi-target agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem*. 2016; 24(7): 1528-39.
- 270 Lan JS, Ding Y, Liu Y, Kang P, Hou JW, Zhang XY, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel coumarin-N-benzyl pyridinium hybrids as multi-target agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem*. 2017; 139: 48-59
- 271 Xie SS, Wang XB, Li JY, Yang L, Kong LY. Design, synthesis and evaluation of novel tacrine-coumarin hybrids as multifunctional cholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem*. 2013; 64: 540-53.

- 272 Xie SS, Wang X, Jiang N, Yu W, Wang KD, Lan JS, et al. Multi-target tacrine-coumarin hybrids: Cholinesterase and monoamine oxidase B inhibition properties against Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem.* 2015; 95: 153-65.
- 273 Sun Q, Peng DY, Yang SG, Zhu XL, Yang WC, Yang GF. Syntheses of coumarin-tacrine hybrids as dual-site acetylcholinesterase inhibitors and their activity against butylcholinesterase, A β aggregation, and β -secretase. *Bioorg Med Chem.* 2014; 22(17): 4784-91.
- 274 Domínguez JL, Fernández-Nieto F, Brea JM; Catto M, Paleo MR, Porto S, et al. 8-Aminomethyl-7-hydroxy-4-methylcoumarins as multitarget leads for Alzheimer's disease. *ChemistrySelect.* 2016; 1: 2742–9.
- 275 Kim JS, Kim JC, Shim SH, Lee EJ, Jin W, Bae K, et al. Chemical constituents of the root of *Dystaenia takeshimana* and their anti-inflammatory activity. *Arch Pharm Res.* 2006; 29(8): 617-23.
- 276 Shen FQ, Wang ZC, Wu SY, Ren SZ, Man RJ, Wang BZ, et al. Synthesis of novel hybrids of pyrazole and coumarin as dual inhibitors of COX-2 and 5-LOX. *Bioorg Med Chem Lett.* 2017; 27(16): 3653-60.
- 277 Zhang N, Chen WJ, Zhou Y, Zhao H, Zhong RG. Rational design of coumarin derivatives as CK2 inhibitors by improving the interaction with the hinge region. *Mol Inform.* 2016; 35(1): 15-8.
- 278 Malini B, Purohit A, Ganeshapillai D, Woo LW, Potter BV, Reed MJ. Inhibition of steroid sulphatase activity by tricyclic coumarin sulphamates. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000; 75(4-5): 253-8.
- 279 Harada K, Kubo H, Tomigahara Y, Nishioka K, Takahashi J, Momose M, et al. Coumarins as novel 17-hydroxysteroid dehydrogenase type 3 inhibitors for potential treatment of prostate cancer. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010; 20(1): 272-5.
- 280 Yamaguchi Y, Nishizono N, Kobayashi D, Yoshimura T, Wada K, Oda K. Evaluation of synthesized coumarin derivatives on aromatase inhibitory activity. *Bioorg Med Chem Lett.* 2017; 27(12): 2645-9.
- 281 Tinel M, Belghiti J, Descatoire V, Amouyal G, Letteron P, Geneve J, et al. Inactivation of human liver cytochrome P450 by the drug methoxsalen and other psoralen derivatives. *Biochem Pharmacol.* 1987; 36: 951-5.
- 282 Chiva-Blanch G, Urpi-Sarda M, Llorach R, Rotches-Ribalta M, Guillen M, Casas R, et al. Differential effects of polyphenols and alcohol of red wine on the expression of adhesion molecules and inflammatory cytokines related to atherosclerosis: a randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr.* 2012; 95: 326-34.
- 283 Hooper L, Kay C, Abdelhamid A, Kroon PA, Cohn JS, Rimm EB, et al. Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Am J Clin Nutr.* 2012; 95: 740-51.
- 284 Zaragoza C, Monserrat J, Mantecón C, Villascusa L, Zaragoza F, Álvarez-Mon M. Antiplatelet activity of flavonoid and coumarin drugs. *Vascul Pharmacol.* 2016; 87: 139-49.
- 285 Quezada E, Delogu G, Picciau C, Santana L, Podda G, Borges F, et al. Synthesis and vasorelaxant and platelet antiaggregatory activities of a new series of 6-halo-3-phenylcoumarins. *Molecules.* 2010; 15(1): 270-9.
- 286 Nguelefack-Mbuyo PE, Nguelefack TB, Dongmo AB, Afkir S, Azebaze AG, Dimo T, et al. Anti-hypertensive effects of the metanol/methylene chloride stem bark extract of *Mammea africana* in 1-NAME-induced hypertensive rats. *J Ethnopharmacol.* 2008; 117: 446-50.
- 287 Tchamadeu MC, Dzeufiet PDD, Nougá CC, Azebaze AG, Allard J, Girolami JP, et al. Hypoglycemic effects of *Mammea africana* (Guttiferae) in diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2010; 127: 368-72.
- 288 Vilar S, Quezada E, Santana L, Uriarte E, Yáñez M, Fraiz N, et al. Design, synthesis, and vasorelaxant and platelet antiaggregatory activities of coumarin-resveratrol hybrids. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006; 16(2): 257-61.
- 289 Fiedler VB, Scholtholt J. Effects of carbocromene on myocardial oxygen consumption in isolated dog hearts. *J Pharmacol Exp Ther.* 1981; 217(2): 306-13.

- 290 Ogawa H, Sasai N, Kamisako T, Baba K. Effects of osthol on blood pressure and lipid metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Ethnopharmacol.* 2007; 112(1): 26-31.
- 291 Shin E, Choi KM, Yoo HS, Lee CK, Hwang BY, Lee MK. Inhibitory effects of coumarins from the stem bark of *Fraxinus rhynchophylla* on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Biol Pharm Bull.* 2010; 33: 1610-4.
- 292 Kim Y, Lee J. Esculetin, a coumarin derivative, suppresses adipogenesis through modulation of the AMPK pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J Funct Foods.* 2015; 12: 509–15.
- 293 Kundu J, Chae IG, Chun KS. Fraxetin Induces Heme Oxygenase-1 Expression by Activation of Akt/Nrf2 or AMP-activated Protein Kinase α /Nrf2 Pathway in HaCaT Cells. *J Cancer Prev.* 2016; 21(3): 135-43.
- 294 Sun M, Hu J, Song X, Wu D, Kong L, Sun Y, et al. Coumarin derivatives protect against ischemic brain injury in rats. *Eur J Med Chem.* 2013; 67: 39-53.
- 295 Molina-Jiménez MF, Sánchez-Reus MI, Benedi J. Effect of fraxetin and myricetin on rotenone-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells: Comparison with N-acetylcysteine. *Eur J Pharmacol.* 2003; 472: 81-7.
- 296 Luszczki JJ, Wojda E, Andres-Mach M, Cisowski W, Glensk M, Glowniak K, et al. Anticonvulsant and acute neurotoxic effects of imperatorin, osthole and valproate in the maximal electroshock seizure and chimney tests in mice: a comparative study. *Epilepsy Res.* 2009; 85: 293-9.
- 297 Sashidhara KV, Modukuri RK, Singh S, Bhaskara Rao K, Aruna Teja G, Gupta S, et al. Design and synthesis of new series of coumarin-aminopyran derivatives possessing potential anti-depressant-like activity. *Bioorg Med Chem Lett.* 2015; 25(2): 337-41.
- 298 Wang C, Pei A, Chen J, Yu H, Sun ML, Liu CF, et al. A natural coumarin derivative esculetin offers neuroprotection on cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *J Neurochem.* 2012; 121: 1007-13.
- 299 Zhu L, Nang C, Luo F, Pan H, Zhang K, Liu J, et al. Esculetin attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammatory processes and depressive-like behavior in mice. *Physiol Behav.* 2016; 163: 184-92.
- 300 Chen X, Pi R, Zou Y, Liu M, Ma X, Jiang Y, et al. Attenuation of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57 BL/6 mice by osthole, a natural coumarin. *Eur J Pharmacol.* 2010; 629: 40-6.
- 301 Yan Y, Kong L, Xia Y, Liang W, Wang L, Song J, et al. Osthole promotes endogenous neural stem cell proliferation and improved neurological function through Notch signaling pathway in mice acute mechanical brain injury. *Brain Behav Immun.* 2018; 67: 118-29.
- 302 Alonso-Castro AJ, Guzmán-Gutiérrez SL, Betancourt CA, Gasca-Martínez D, Álvarez-Martínez KL, Pérez-Nicolás M, et al. Antinociceptive, anti-inflammatory, and central nervous system (CNS) effects of the natural coumarin soulattrolide. *Drug Dev Res.* 2018; 79(7): 332-8.
- 303 Takaoka M. Resveratrol, a new phenolic compound from *Veratrum grandiflorum*. *Nippon Kagaku Kaishi.* 1939; 60: 1090-100.
- 304 Frémont L. Biological effects of Resveratrol. *Life Sci.* 2000; 66(8): 663-73.
- 305 Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. The world of resveratrol. *Adv Exp Med Biol.* 2001; 492: 159-82.
- 306 Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean ME, Crozier A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J Agric Food Chem.* 2002; 50: 3337-40.
- 307 Lamuela-Raventos RM, Romero-Pérez AI, Waterhouse AL, de la Torre-Boronat MC. Direct HPLC analysis of *cis*- and *trans*-resveratrol and piceid isomers in Spanish red *Vitis vinifera* wines. *J Agric Food Chem.* 1995; 43: 281-3.
- 308 Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Wine as a biological fluid: history, production and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal.* 1997; 11: 287-313.
- 309 Langcake P, Pryce RJ. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia.* 1977; 33(2): 151-2.

- 310 Singh CK, Liu X, Ahmad N. Resveratrol, in its natural combination in whole grape, for health promotion and disease management. *Ann N Y Acad Sci.* 2015; 1348(1): 150-60.
- 311 Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5(6): 493-506.
- 312 Siemann EH, Creasy LL. Concentration of the Phytoalexin resveratrol in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 1992; 43: 49-52.
- 313 Rege SD, Geetha T, Griffin GD, Broderick TL, Babu JR. Neuroprotective effects of resveratrol in Alzheimer disease pathology. *Front Aging Neurosci.* 2014; 6: 218.
- 314 Gambini J, Inglés M, Olaso G, Lopez-Grueso R, Bonet-Costa V, Gimeno-Mallench L et al. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 2015: 837042.
- 315 Carrizzo A, Forte M, Damato A, Trimarco V, Salzano F, Bartolo M, et al. Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food Chem Toxicol.* 2013; 61: 215-26.
- 316 Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet.* 1993; 341: 1103-4.
- 317 Belguendouz L, Frémont L, Gozzelino MT. Interaction of transresveratrol with plasma lipoproteins. *Biochem Pharmacol.* 1998; 55(6): 811-6.
- 318 Ferretta A, Gaballo A, Tanzarella P, Piccoli C, Capitanio N, Nico B, et al. Effect of resveratrol on mitochondrial function: implications in parkin-associated familial Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1842(7): 902-15.
- 319 Blanchet J, Longpré F, Bureau G, Morissette M, DiPaolo T, Bronchti G, et al. Resveratrol, a red wine polyphenol, protects dopaminergic neurons in MPTP-treated mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008; 32(5): 1243-50.
- 320 Lançon A, Frazzi R, Latruffe N. Anti-Oxidant, Anti-Inflammatory and Anti-Angiogenic Properties of Resveratrol in Ocular Diseases. *Molecules.* 2016; 21(3): 304.
- 321 Peng W, Ma YY, Zhang K, Zhou AY, Zhang Y, Wang H, et al. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Resveratrol-NSAID Derivatives as Anti-inflammatory Agents. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2016; 64(6): 609-15.
- 322 Capirolla H, Vingtdoux V, Zhao H, Sankowski R, Al-Abed Y, Davies P, et al. Resveratrol mitigates lipopolysaccharide- and A β -mediated microglial inflammation by inhibiting the TLR4/NF- κ B/STAT signaling cascade. *J Neurochem.* 2012; 120(3): 461-72.
- 323 Saiko P, Szakmary A, Jaeger W, Szekeres T. Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutat Res.* 2008; 658(1-2): 68-94.
- 324 Kutil Z, Temml V, Maghradze D, Pribylova M, Dvorakova M, Schuster D et al. Impact of wines and wine constituents on cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2, and 5-lipoxygenase catalytic activity. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014: 178931.
- 325 North BJ, Verdin E. Sirtuins. Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. *Genome Biol.* 2004; 5(5): 224.
- 326 Toiber D, Sebastian C, Mostoslavsky R. Characterization of nuclear sirtuins: molecular mechanisms and physiological relevance. *Handb Exp Pharmacol.* 2011; 206: 189-224.
- 327 Dali-Youcef N, Lagouge M, Froelich S, Koehl C, Schoonjans K, Auwerx. Sirtuins: the 'magnificent seven', function, metabolism and longevity. *Ann Med.* 2007; 39(5): 335-45.
- 328 Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J.* 2007; 404(1): 1-13.
- 329 Gomes BAQ, Silva JPB, Romeiro CFR, Dos Santos SM, Rodrigues CA, Gonçalves PR, et al. Neuroprotective Mechanisms of Resveratrol in Alzheimer's Disease: Role of SIRT1. *Oxid Med Cell Longev.* 2018; 2018: 8152373.
- 330 Lalla R, Donmez G. The role of sirtuins in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.* 2013; 5: 16.
- 331 Rege SD, Geetha T, Griffin GD, Broderick TL, Babu JR. Neuroprotective effects of resveratrol in Alzheimer disease pathology. *Front Aging Neurosci.* 2014; 6: 218.

- 332 Westphal CH, Dipp MA, Guarente L. A therapeutic role for sirtuins in diseases of aging? Trends Biochem Sci. 2007; 32(12): 555-60.
- 333 Xia N, Strand S, Schluter F, Siuda D, Reifenberg G, Kleinert H et al. Role of SIRT1 and FOXO factors in eNOS transcriptional activation by resveratrol. Nitric Oxide. 2013; 32: 29-35.
- 334 Yáñez M, Fraiz N, Cano E, Orallo F. Inhibitory effects of cis- and trans-resveratrol on noradrenaline and 5-hydroxytryptamine uptake and on monoamine oxidase activity. Biochem Biophys Res Commun. 2006; 344(2): 688-95.
- 335 Tang YW1, Shi CJ1, Yang HL1, Cai P1, Liu QH1, Yang XL1 et al. Synthesis and evaluation of isoprenylation-resveratrol dimer derivatives against Alzheimer's disease. Eur J Med Chem. 2019; 163: 307-19.
- 336 Lan JS, Liu Y, Hou JW, Yang J, Zhang XY, Zhao Y et al. Design, synthesis and evaluation of resveratrol-indazole hybrids as novel monoamine oxidases inhibitors with amyloid- β aggregation inhibition. Bioorg Chem. 2018; 76: 130-9.
- 337 Tzvetkov NT, Hinz S, Küppers P, Gastreich M, Müller CE. Indazole- and indole-5-carboxamides: selective and reversible monoamine oxidase B inhibitors with subnanomolar potency. J Med Chem. 2014; 57(15): 6679-703.
- 338 Prasad S, Tyagi AK, Aggarwal BB. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice. Cancer Res Treat. 2014; 46: 2-18.
- 339 Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": From Kitchen to Clinic. Biochem Pharmacol. 2008; 75(4): 787-809.
- 340 Oppenheimer A. Narrowing of the intervertebral foramina as a cause of pseudorheumatic pain. Ann Surg. 1937; 106(3): 428-40.
- 341 Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, Tharakan ST, Sung B, Anand P. Potential of spice-derived phytochemicals for cancer prevention. Planta Med 2008; 74: 1560-9
- 342 Aggarwal BB, Yuan W, Li S, Gupta SC. Curcumin-free turmeric exhibits anti-inflammatory and anticancer activities: identification of novel components of turmeric. Mol Nutr Food Res. 2013; 57: 1529-42.
- 343 Rainey N, Motte L, Aggarwal BB, Petit PX. Curcumin hormesis mediates a cross-talk between autophagy and cell death. Cell Death Dis. 2015; 6: e2003.
- 344 Aggarwal BB, Deb L, Prasad S. Curcumin differs from tetrahydrocurcumin for molecular targets, signaling pathways and cellular responses. Molecules. 2015; 20: 185-205.
- 345 Kulkarni SK, Dhir A. An overview of curcumin in neurological disorders. Indian J Pharm Sci. 2010; 72(2): 149-54.
- 346 Mythri RB, Bharath MM. Curcumin: a potential neuroprotective agent in Parkinson's disease. Curr Pharm Des. 2012; 18(1): 91-9.
- 347 Chin D, Huebbe P, Pallauf K, Rimbach G. Neuroprotective properties of curcumin in Alzheimer's disease--merits and limitations. Curr Med Chem. 2013; 20(32): 3955-85.
- 348 Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. Mol Pharm 2007; 4: 807-18.
- 349 Nair HB, Sung B, Yadav VR, Kannappan R, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Delivery of antiinflammatory nutraceuticals by nanoparticles for the prevention and treatment of cancer. Biochem Pharmacol. 2010; 80: 1833-43.
- 350 Gupte PA, Giramkar SA, Harke SM, Kulkarni SK, Deshmukh AP, Hingorani LL, et al. Evaluation of the efficacy and safety of Capsule Longvida® Optimized Curcumin (solid lipid curcumin particles) in knee osteoarthritis: a pilot clinical study. J Inflamm Res. 2019; 12: 145-52.
- 351 Kocaadam B, Şanlıer N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. Crit Rev Food Sci Nutr. 2017; 57(13): 2889-95.
- 352 Sahu PK, Sahu PK, Sahu PL, Agarwal DD. Structure activity relationship, cytotoxicity and evaluation of antioxidant activity of curcumin derivatives. Bioorg Med Chem Lett. 2016; 26: 1342-7.

- 353 Majumdar APN, Banerjee S, Nautiyal J, Patel BB, Patel V, Du J et al. Curcumin Synergizes With Resveratrol to Inhibit Colon Cancer. *Nutr Cancer*. 2009; 61(4): 544–553.
- 354 Cai T, Mazzoli S, Bechi A, Addonisio P, Mondaini N, Pagliai RC et al. *Serenoa repens* associated with *Urtica dioica* (ProstaMEV) and curcumin and quercetin (FlogMEV) extracts are able to improve the efficacy of prulifloxacin in bacterial prostatitis patients: results from a prospective randomised study. *Int J Antimicrob Agents*. 2009; 33: 549–53.
- 355 Kunnumakkara AB, Bordoloi D, Padmavathi G, Monisha J, Roy NK, Prasad S, et al. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *Br J Pharmacol*. 2017; 174(11): 1325-48.
- 356 Tuorkey MJ. Curcumin a potent cancer preventive agent: mechanisms of cancer cell killing. *Interv Med Appl Sci*. 2014; 6: 139–46.
- 357 Boyanapalli SS, Tony Kong AN. “Curcumin, the king of spices”: epigenetic regulatory mechanisms in the prevention of cancer, neurological, and inflammatory diseases. *Curr Pharmacol Rep*. 2015; 1: 129–39.
- 358 Hasima N, Aggarwal BB. Targeting proteasomal pathways by dietary curcumin for cancer prevention and treatment. *Curr Med Chem*. 2014; 21: 1583–94.
- 359 Reddy S, Aggarwal BB. Curcumin is a non-competitive and selective inhibitor of phosphorylase kinase. *FEBS Lett*. 1994; 341: 19–22.
- 360 Menon VP, Sudheer AR. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Exp Med Biol*. 2007; 595: 105-25.
- 361 Wright JS. Predicting the antioxidant activity of curcumin and curcuminoids. *J Mol Struct (Theochem)*. 2002; 591: 207-17.
- 362 Jovanovic SV, Steenken S, Boone CW, Simic MG. H-atom transfer is a preferred antioxidant mechanism of curcumin. *J Am Chem Soc*. 1999; 121: 9677-81.
- 363 Barclay LR, Vinqvist MR, Mukai K, Goto H, Hashimoto Y, Tokunaga A, et al. The antioxidant mechanism of curcumin: Classical methods are needed to determine antioxidant mechanism and activity. *Org Lett*. 2000; 2(18): 2841-3.
- 364 Priyadarsini KI, Maity DK, Naik GH, Kumar MS, Unnikrishnan MK, Satav JG. Role of phenolic O:H and methylene hydrogen on the free radical reaction and antioxidant activity of curcumin. *Free Radical Biol Med*. 2003; 35(5): 475-484.
- 365 Sun YM, Zhang HY, Chen DZ, Liu CB. Theoretical elucidation on the antioxidant mechanism of curcumin: A DFT study. *Org Lett*. 2002; 4(17): 2909-11.
- 366 Litwinienko G, Ingold KU. Abnormal solvent effect on hydrogen atom abstraction: Resolution of the curcumin antioxidant controversy. The role of sequential proton loss electron transfer. *J Org Chem*. 2004; 69(18): 5888-96.
- 367 Jha NS, Mishra S, Jha SK, Suro A. Antioxidant activity and electrochemical elucidation of the enigmatic redox behavior of curcumin and its structurally modified analogues. *Electrochimica Acta*. 2015; 151: 574-83.
- 368 Bandgar BP, Kinkar SN, Chavan HV, Jalde SS, Shaikh RU, Gacche RN. Synthesis and biological evaluation of asymmetric indole curcumin analogs as potential anti-inflammatory and antioxidant agents. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2014; 29(1): 7-11.
- 369 Nimiya Y, Wang W, Du Z, Sukamtoh E, Zhu J et al. Redox modulation of curcumin stability: Redox active antioxidants increase chemical stability of curcumin. *Mol Nutr Food Res*. 2016; 60(3): 487-94.
- 370 Huang HC, Chang P, Dai XL, Jiang ZF. Protective effects of curcumin on amyloid-beta-induced neuronal oxidative damage. *Neurochem Res*. 2012; 37(7): 1584-97.
- 371 Grundman M, Grundman M, Delaney P. Antioxidant strategies for Alzheimer’s disease. *Proc Nutr Soc*. 2002; 61(2): 191-202.
- 372 Abidi A, Gupta S, Agarwal M, Bhalla HL, Saluja M. Evaluation of efficacy of curcumin as an add-on therapy in patients of bronchial asthma. *J Clin Diagn Res*. 2014; 8: HC19–HC24.
- 373 Chan MM, Huang HI, Fenton MR, Fong D. In vivo inhibition of nitric oxide synthase gene expression by curcumin, a cancer preventive natural product with anti-inflammatory properties. *Biochem Pharmacol*. 1998; 55(12): 1955-62.

- 374 Bharti AC, Takada Y, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits receptor activator of NF-kappa B ligand-induced NF-kappa B activation in osteoclast precursors and suppresses osteoclastogenesis. *J Immunol.* 2004; 172: 5940–47.
- 375 Shishodia S, Amin HM, Lai R, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF-kappaB activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. *Biochem Pharmacol.* 2005; 70(5): 700–13.
- 376 Aggarwal BB, Sung B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends Pharmacol Sci.* 2009; 30(2): 85–94
- 377 Gupta SC, Tyagi AK, Deshmukh-Taskar P, Hinojosa M, Prasad S, Aggarwal BB. Downregulation of tumor necrosis factor and other proinflammatory biomarkers by polyphenols. *Arch Biochem Biophys.* 2014; 559: 91–9.
- 378 Zhang F, Altorki NK, Mestre JR, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Curcumin inhibits cyclooxygenase-2 transcription in bile acid- and phorbol ester-treated human gastrointestinal epithelial cells. *Carcinogenesis.* 1999; 20(3): 445–51.
- 379 Renuga Parameswari A, Rajalakshmi G, Kumaradhas P. A combined molecular docking and charge density analysis is a new approach for medicinal research to understand drug-receptor interaction: curcumin-AChE model. *Chem Biol Interact.* 2015; 225: 21–31.
- 380 Akinyemi AJ, Oboh G, Fadaka AO, Olatunji BP, Akomolafe S. Curcumin administration suppress acetylcholinesterase gene expression in cadmium treated rats. *Neurotoxicology.* 2017; 62: 75–9.
- 381 Akinyemi AJ, Okonkwo PK, Faboya OA, Onikanni SA, Fadaka A, Olayide I, et al. Curcumin improves episodic memory in cadmium induced memory impairment through inhibition of acetylcholinesterase and adenosine deaminase activities in a rat model. *Metab Brain Dis.* 2017; 32(1): 87–95.
- 382 Wang J, Du XX, Jiang H, Xie JX. Curcumin attenuates 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity by anti-oxidation and nuclear factor-kappa B modulation in MES23.5 cells. *Biochem Pharmacol.* 2009; 78(2): 178–83.
- 383 Huang WT, Niu KC, Chang CK, Lin MT, Chang CP. Curcumin inhibits the increase of glutamate, hydroxyl radicals and PGE2 in the hypothalamus and reduces fever during LPS-induced systemic inflammation in rabbits. *Eur J Pharmacol.* 2008; 593(1–3): 105–11.
- 384 Wang SL, Li Y, Wen Y, Chen YF, Na LX, Li ST, et al. Curcumin, a potential inhibitor of up-regulation of TNF-alpha and IL-6 induced by palmitate in 3T3-L1 adipocytes through NF-kappaB and JNK pathway. *Biomed Environ Sci.* 2009; 22(1): 32–9.
- 385 Zbarsky V, Datla KP, Parkar S, Rai DK, Aruoma OI, Dexter DT. Neuroprotective properties of the natural phenolic antioxidants curcumin and naringenin but not quercetin and fisetin in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Free Radic Res.* 2005; 39(10): 1119–25.
- 386 Yu S, Zheng W, Xin N, Chi ZH, Wang NQ, Nie YX, et al. Curcumin prevents dopaminergic neuronal death through inhibition of the c-Jun N-terminal kinase pathway. *Rejuvenation Res.* 2010; 13(1): 55–64.
- 387 Wang XS, Zhang ZR, Zhang MM, Sun MX, Wang WW, Xie CL. Neuroprotective properties of curcumin in toxin-base animal models of Parkinson's disease: a systematic experiment literatures review. *BMC Complement Altern Med.* 2017; 17(1): 412.
- 388 Huang HC, Jiang ZF. Accumulated amyloid- β peptide and hyperphosphorylated tau protein: relationship and links in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2009; 16: 15–27.
- 389 Kim Y, Clifton P. Curcumin, Cardiometabolic Health and Dementia. *Int J Environ Res Public Health.* 2018; 15(10). pii: E2093.
- 390 Garcia-Alloza M, Borrelli LA, Rozkalne A, Hyman BT, Bacskai BJ. Curcumin labels amyloid pathology *in vivo*, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model. *J Neurochem.* 2007; 102: 1095–104.
- 391 Liu H, Li Z, Qiu D, Gu Q, Lei Q, Mao L. The inhibitory effects of different curcuminoids on β -amyloid protein, β -amyloid precursor protein and β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 in swAPP HEK293 cells. *Neurosci Lett.* 2010; 485: 83–8.

- 392 Shimmyo Y, Kihara T, Akaike A, Niidome T, Sugimoto H. Epigallocatechin- 3-gallate and curcumin suppress amyloid beta-induced beta-site APP cleaving enzyme-1 upregulation. *Neuroreport*. 2008; 19: 1329-33.
- 393 Lin R, Chen X, Li W, Han Y, Liu P, Pi R. Exposure to metal ions regulates mRNA levels of APP and BACE-1 in PC12 cells: blockage by curcumin. *Neurosci Lett*. 2008; 440: 344-7.
- 394 Bates KA, Verdile G, Li QX, Ames D, Hudson P, Masters CL, et al. Clearance mechanisms of Alzheimer's amyloid-beta peptide: implications for therapeutic design and diagnostic tests. *Mol Psychiatry*. 2009; 14: 469-86.
- 395 Wang YJ, Thomas P, Zhong JH, Bi FF, Kosaraju S, Pollard A, et al. Consumption of grape seed extract prevents amyloid- β deposition and attenuates inflammation in brain of an Alzheimer's disease mouse. *Neurotox Res*. 2009; 15: 3-14.
- 396 Zhang X, Yin WK, Shi XD, Li Y. Curcumin activates Wnt/ β -catenin signaling pathway through inhibiting the activity of GSK-3 β in APPswe transfected SY5Y cells. *Eur J Pharm Sci*. 2011; 42: 540-6.
- 397 Wouters J. Structural aspects of monoamine oxidase and its reversible inhibition. *Curr Med Chem*. 1998; 5(2): 137-62.
- 398 Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961; 7: 88-95.
- 399 Haghighijoo Z, Firuzi O, Hemmateenejad B, Emami S, Edraki N, Miri R. Synthesis and biological evaluation of quinazolinone-based hydrazones with potential use in Alzheimer's disease. *Bioorg Chem*. 2017; 74: 126-33.
- 400 Carradori S, Secci D, Bolasco A, De Monte C, Yáñez M. Synthesis and selective inhibitory activity against human COX-1 of novel 1-(4-substituted-thiazol-2-yl)-3,5-di(hetero)aryl-pyrazoline derivatives. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2012; 345(12): 973-9.
- 401 Zhong W, Liu N, Xie Y, Zhao Y, Song X, Zhong W. Antioxidant and anti-aging activities of mycelial polysaccharides from *Lepista sordida*. *Int J Biol Macromol*. 2013; 60: 355-9.
- 402 Teppola H, Sarkanen JR, Jalonen TO, Linne ML. Morphological Differentiation Towards Neuronal Phenotype of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells by Estradiol, Retinoic Acid and Cholesterol. *Neurochem Res*. 2016; 41(4): 731-47.
- 403 Mossman T. Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: application to proliferation and citotoxicity assays. *J. Immunol. Meths*. 1983; 65: 55-63.
- 404 Armstrong D. Advanced protocols in oxidative stress III. *Adv Protoc Oxidative Stress III*. 2014; 594: 1-477
- 405 Bachman J. Reverse-transcription PCR (RT-PCR). *Methods Enzymol*. 2013; 530: 67-74.
- 406 Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2001; 46: 3-26.
- 407 Song X, Chen J, Zhao M, Zhang C, Yu Y, Lonard DM et al. Development of potent small-molecule inhibitors to drug the undruggable steroid receptor coactivator-3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113(18): 4970-5.
- 408 Di L, Kerns EH, Fan K, McConnell OJ, Carter GT. High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. *Eur J Med Chem*. 2003; 38(3): 223-32.
- 409 Rodríguez-Franco MI, Fernández-Bachiller MI, Pérez C, Hernández-Ledesma B, Bartolomé B. Novel tacrine-melatonin hybrids as dual-acting drugs for Alzheimer disease, with improved acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties. *J Med Chem*. 2006; 49(2): 459-62.
- 410 Matos MJ, Vilar S, Gonzalez-Franco RM, Uriarte E, Santana L, Friedman C et al. Novel (coumarin-3-yl) carbamates as selective MAO-B inhibitors: synthesis, in vitro and in vivo assays, theoretical evaluation of ADME properties and docking study. *Eur J Med Chem*. 2013; 63: 151-61.
- 411 Lueptow LM. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *J Vis Exp*. 2017; (126).

- 412 Campaña-Seoane M, Pérez-Gago A, Vázquez G, Conde N, González P, Martínez A et al. Vaginal residence and pharmacokinetic preclinical study of topical vaginal mucoadhesive W/S emulsions containing ciprofloxacin. *Int J Pharm*. 2019; 554: 276-83.
- 413 Hu B, Xiong B, Qiu BY, Li X, Yu HP, Xiao K et al. Construction of a small peptide library related to inhibitor OM99-2 and its structure-activity relationship to beta-secretase. *Acta Pharmacol Sin*. 2006; 27(12): 1586-93.
- 414 Marzo A, Dal Bo L, Monti NC, Crivelli F, Ismaili S, Caccia C et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of safinamide, a neuroprotectant with antiparkinsonian and anticonvulsant activity. *Pharmacol Res*. 2004; 50(1): 77-85.
- 415 Kupsch A, Sautter J, Götz ME, Breithaupt W, Schwarz J, Youdim MB et al. Monoamine oxidase-inhibition and MPTP-induced neurotoxicity in the non-human primate: comparison of rasagiline (TVP 1012) with selegiline. *J Neural Transm (Vienna)*. 2001; 108(8-9): 985-1009.
- 416 Edmondson DE, Binda C. Monoamine Oxidases. *Subcell Biochem*. 2018; 87: 117-39.
- 417 Matos MJ, Terán C, Pérez-Castillo Y, Uriarte E, Santana L, Viña D. Synthesis and study of a series of 3-arylcoumarins as potent and selective monoamine oxidase B inhibitors. *J Med Chem*. 2011; 54(20): 7127-37.
- 418 Delogu G, Picciau C, Ferino G, Quezada E, Podda G, Uriarte E et al. Synthesis, human monoamine oxidase inhibitory activity and molecular docking studies of 3-heteroarylcoumarin derivatives. *Eur J Med Chem*. 2011; 46(4): 1147-52.
- 419 Matos MJ, Viña D, Janeiro P, Borges F, Santana L, Uriarte E. New halogenated 3-phenylcoumarins as potent and selective MAO-B inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010; 20(17): 5157-60.
- 420 Serra S, Ferino G, Matos MJ, Vázquez-Rodríguez S, Delogu G, Viña D et al. Hydroxycoumarins as selective MAO-B inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012; 22(1): 258-61.
- 421 Yáñez M, Padín JF, Arranz-Tagarro JA, Camiña M, Laguna R. History and therapeutic use of MAO-A inhibitors: a historical perspective of mao-a inhibitors as antidepressant drug. *Curr Top Med Chem*. 2012; 12(20): 2275-82.
- 422 Müller T, Möhr JD. Pharmacokinetics of monoamine oxidase B inhibitors in Parkinson's disease: current status. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2019; 15(5): 429-35.
- 423 Rojas RJ, Edmondson DE, Almos T, Scott R, Massari ME. Reversible and irreversible small molecule inhibitors of monoamine oxidase B (MAO-B) investigated by biophysical techniques. *Bioorg Med Chem*. 2015; 23(4): 770-8.
- 424 De Ferrari GV, Canales MA, Shin I, Weiner LM, Silman I, Inestrosa NC. A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid beta-peptide fibril formation. *Biochemistry*. 2001; 40(35): 10447-57.
- 425 Inestrosa NC, Alvarez A, Pérez CA, Moreno RD, Vicente M, Linker C et al. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron*. 1996; 16(4): 881-91.
- 426 Lane RM, Kivipelto M, Greig NH. Acetylcholinesterase and its inhibition in Alzheimer disease. *Clin Neuropharmacol*. 2004; 27(3): 141-9.
- 427 Abdshahzadeh H, Golshani M, Nadri H, Saberi Kia I, Abdolahi Z, Forootanfar H et al. 3-Aryl Coumarin Derivatives Bearing Aminoalkoxy Moiety as Multi-Target-Directed Ligands against Alzheimer's Disease. *Chem Biodivers*. 2019; 16(5): e1800436.
- 428 de Souza GA, da Silva SJ, Del Cistia CN, Pitasse-Santos P, Pires LO, Passos YM et al. Discovery of novel dual-active 3-(4-(dimethylamino)phenyl)-7-aminoalkoxy-coumarin as potent and selective acetylcholinesterase inhibitor and antioxidant. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2019; 34(1): 631-37.
- 429 Zhou X, Wang XB, Wang T, Kong LY. Design, synthesis, and acetylcholinesterase inhibitory activity of novel coumarin analogues. *Bioorg Med Chem*. 2008; 16(17): 8011-21.
- 430 Abel EL. Further evidence for the dissociation of locomotor activity and head dipping in rats. *Physiol Behav*. 1995; 57(3): 529-32.

- 431** Engberg G, Elebring T, Nissbrandt H. Deprenyl (selegiline), a selective MAO-B inhibitor with active metabolites; effects on locomotor activity, dopaminergic neurotransmission and firing rate of nigral dopamine neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991; 259(2): 841-7
- 432** Hellriegel ET, Bjornsson TD, Hauck WW. Interpatient variability in bioavailability is related to the extent of absorption: implications for bioavailability and bioequivalence studies. *Clin Pharmacol Ther.* 1996; 60(6): 601-7.





ANEXOS



**ACORDO DE COLABORACIÓN ENTRE A FUNDACIÓN PÚBLICA
CENTRO DE TRANSFUSION DE GALICIA E A UNIVERSIDADE DE
SANTIAGO DE COMPOSTELA, PARA A CESIÓN DE MOSTRAS
BIOLÓXICAS**

Santiago de Compostela, 25 de xaneiro de 2010.

Dunha parte, Dna. María Inmaculada Rodríguez Calvo, Directora Técnica da Fundación Pública Centro de Transfusión de Galicia (en adiante CTG), segundo nomeamento efectuado na Orde 25 de agosto de 2009, de 4 de setembro (DOG 174), actuando en nome e representación da mesma en virtude dos seus estatutos, publicados no Decreto 276/2001, con CIF V15424401 e sede social en Avda. Monte da Condesa s/n de Santiago de Compostela.

Doutra parte, D. Senén Barro Ameneiro, Reitor da Universidade de Santiago de Compostela (en adiante USC) segundo nomeamento efectuado polo Decreto 93/2006, de 1 de xuño (DOG de 8 de xuño), actuando en nome e representación da mesma en virtude dos poderes outorgados polo artigo 20 da Lei Orgánica 6/2001, de 21 de decembro de Universidades, e do artigo 87 do Decreto 28/2004, do 22 de xaneiro, polo que se aproban os Estatutos da Universidade de Santiago de Compostela, con CIF Q1518001A e sede social no Pazo de San Xerome, praza do Obradoiro de Santiago de Compostela

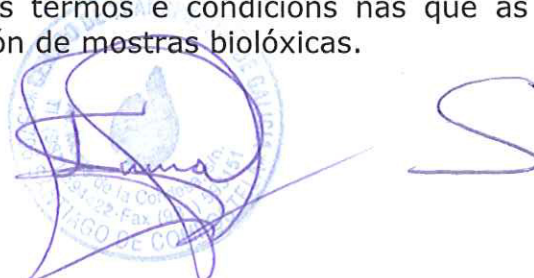
Ambas partes recoñécense con capacidade legal suficiente para subscribir o presente acordo de colaboración e,

MANIFESTAN

Que a Fundación Pública Centro de Transfusión de Galicia (CTG) extrae, procesa, fracciona e distribúe o sangue doado de xeito altruísta, ós centros sanitarios da Comunidade Autónoma de Galicia e que, a consecuencia desta actividade, prodúcese certa cantidade de produto de refugallo.

Que a USC, a través de diferentes Departamentos e Grupos de Investigación, solicita ó CTG certa cantidade deste produto, con destino á docencia e á investigación.

Que as dúas partes consideran conveniente o establecemento dun acordo de colaboración polo que se regulen os termos e condicións nas que as entidades asinantes participarán na cesión de mostras biolóxicas.



Por todo isto formalizan o presente protocolo de acordo coas seguintes

CLÁUSULAS:

PRIMEIRA: O CTG comprométese a ceder, segundo a súa dispoñibilidade, á USC, mostras biolóxicas de refugallo, procesadas e anonimizadas de acordo coa lexislación vixente en materia de protección de datos de carácter persoal (Lei Orgánica 15/1999) e de investigación biomédica (Lei 14/2007).

SEGUNDA: A USC comprométese a destinar as mostras para uso exclusivamente docente e investigador e a se responsabilizar do tratamento final das mostras, como residuo sanitario, de acordo coa normativa vixente.

TERCEIRA: O CTG quedará eximido de responsabilidade civil e de calquera outra que puidera xurdir, ante o risco derivado da manipulación ou refugallo das mostras cedidas.

CUARTA: A xestión da entrega das mostras establecerase de acordo co responsable da unidade funcional do CTG que, en cada caso, a deba facer efectiva.

QUINTA: A colaboración prevista no presente acordo establécese con carácter gratuíto de común acordo entre ambos centros.

SEXTA: A duración do presente acordo de colaboración será de un ano dende a data da súa formalización, prorrogable anualmente salvo denuncia por calquera das partes con un mes de antelación á data de finalización do presente acordo.

En proba de conformidade, asínase o presente polas partes en duplicado exemplar e na data arriba indicada.

Pola Universidade de Santiago de
Compostela



Asdo. Senén Barro Ameneiro
Reitor

Pola Fundación Pública Centro
de Transfusión de Galicia



Asdo. María Inmaculada Rodríguez Calvo
Directora Técnica



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Research paper

Synthesis and structure-activity relationship study of novel 3-heteroaryl coumarins based on pyridazine scaffold as selective MAO-B inhibitors



María Carmen Costas-Lago ^a, Pedro Besada ^a, Fernanda Rodríguez-Enríquez ^b, Dolores Viña ^b, Santiago Vilar ^c, Eugenio Uriarte ^{c,d}, Fernanda Borges ^e, Carmen Terán ^{a,*}

^a Departamento de Química Orgánica and Instituto de Investigación Sanitaria Galicia Sur (IISGS), Universidade de Vigo, 36310 Vigo, Spain

^b Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS) Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

^c Departamento de Química Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

^d Instituto de Ciencias Químicas Aplicadas, Universidad Autónoma de Chile, 7500912 Santiago, Chile

^e CIQUP/Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, 4169-007 Porto, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 June 2017

Received in revised form

19 July 2017

Accepted 21 July 2017

Available online 25 July 2017

Keywords:

Coumarin

Pyridazine

MAO-B

Neurodegenerative disorders

Molecular modeling

ADME

ABSTRACT

Compounds of hybrid structure pyridazine-coumarin were discovered as potent, selective and reversible inhibitors of monoamine oxidase B (MAO-B). These compounds were synthesized in good yield following a multistep approach based on Knoevenagel reaction and using as key intermediate pyridazinone **16**, which was obtained from maleic anhydride and furan. Compounds **9b** and **9d** are the most active compounds of these series, with IC₅₀ values in the sub-micromolar range, and lack of cytotoxic effects. Theoretical calculation of ADME properties also suggested a good pharmacokinetic profile for both compounds.

Docking simulations provided insights into enzyme inhibitor interactions and allowed us to rationalize the observed structure-activity relationships (SARs).

© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Monoamine oxidase (MAO) is a FAD-dependent oxidoreductase located in the mitochondrial outer membrane of glia, neurons and other mammalian tissue cells, such as liver, kidney, intestinal epithelium, or glandular cells [1]. Two isoenzymes of MAO have been identified and characterized, the MAO-A and MAO-B, both have about 70% sequence identity, showing differences not only in their tissue distribution but also in substrate and inhibitor specificity [2]. MAO-A is the most ubiquitous MAO isoform, playing an important role in deactivation of neurotransmitter, dietary and xenobiotic amines, such as norepinephrine, serotonin, dopamine and tyramine, while MAO-B is the predominant isoform in brain, where it helps to metabolize dopamine and also β -phenylethylamine, an endogenous amine that promotes dopamine release and

inhibits its neuronal reuptake, without affecting the serotonin or norepinephrine metabolism [3]. These properties determine the clinical importance of both isoforms as targets for drug design, such as antidepressant (MAO-A) or neuroprotective (MAO-B) agents.

The MAO-catalyzed deamination reaction produces ammonia, the corresponding aldehyde and hydrogen peroxide, a reactive oxygen species (ROS) which normally is inactivated by glutathione peroxidase; however, it can be also converted by metal ions, such as the ferrous ion Fe²⁺, into the highly reactive hydroxyl radical causing neurotoxicity [4].

The MAO-B levels in the human species increases during aging and the oxidative stress induced by MAO in brain is a potential risk factor for neuronal damage and death in aging and age related neurodegenerative disorders, among them Parkinson's (PD) and Alzheimer's disease (AD) [2].

Nowadays, selective inhibition of MAO-B is considered as a good therapeutic option for PD in order to reduce the metabolic degradation of dopamine. Thus, selegiline (**1**, Fig. 1) and rasagiline (**2**),

* Corresponding author.

E-mail address: mcteran@uvigo.es (C. Terán).

two irreversible MAO-B inhibitors (MAOI-B), are commonly used for symptomatic treatment of PD [5]. Another MAOI-B, safinamide (3), was recently approved in the European Union (EU) for treatment of PD [6]. Safinamide has both dopaminergic (via reversible MAO-B inhibition) and non-dopaminergic properties, acting also as modulator of glutamate release through the inhibition of voltage-gated sodium and calcium channels [6].

In addition, several studies point out the neuroprotective role of MAOI-B in order to prevent the progression of PD and other neurodegenerative diseases, including AD [4,7]. In fact, the interest in selective MAOI-B has increased in the last few years [8], due to not only their therapeutic potential for this kind of disorders but also other pathologies in which the hyperactivity of this isoenzyme plays a crucial role [8a]. The research in this field has resulted in a significant number of compounds based on great variety of nitrogen and/or oxygen-containing cores [8a–b,9,10], among them it is noteworthy the coumarin scaffold [8a,10c–e]. Different substitution patterns at the coumarin ring have been studied in order to develop potent and selective MAOI-B. Substitution at 3 position with an acyl function, such as carboxamide (compound 4) or carbohydrazide (compound 5), or an aryl group (compound 6), are some of the most interesting [11] (Fig. 2). For instance, 3-phenylcoumarins induce strong activity and selectivity against human MAO-B (hMAO-B), showing outstanding differences with the kind of substituents and their position at the phenyl rings [11c–d,12]. A small group (methyl or methoxy) at C6 of the coumarin core seems to be important for both effects and methoxy, methyl and bromine were the preferred substituents at the 3-phenyl ring. In addition, replacement of the phenyl group at C3 by some heterocyclic cores, like thiophene or indole, provided new hMAOI-B (compounds 7 and 8, Fig. 2). However, these compounds inhibited the hMAO-B activity in the sub-micromolar range only when a methoxy group was located at C6 or C7 of the coumarin nucleus [13].

In this work we describe three new series of 3-heteroarylcoumarins showing at C3 a halogen (bromine, chlorine) or methoxy substituted pyridazine ring and a methyl or methoxy group at C6, C7 or C8 of the coumarin core (compounds 9–11, Fig. 2). These novel 3-heteroaryl analogues, which combine in their structure two privileged scaffolds for drug design [14], coumarin and pyridazine [15], were proposed with the aim to analyse the effect of bioisosteric substitution benzene/pyridazine on MAO-B affinity and selectivity.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

The target compounds 9–11 were synthesized following the multi-step strategy shown in Schemes 1 and 2. This approach was based on Knoevenagel reaction of pyridazinone 16 with the appropriate *o*-hydroxybenzaldehyde.

The key synthon 16 was obtained in four steps from maleic anhydride and furan and via the enol-lactone 15 [16], such as was displayed in Scheme 1. Although Wittig reaction between stabilized phosphoranes and cyclic anhydrides supposes a direct approach to get enol-lactones unsatisfactory results were obtained when this

methodology was applied to maleic anhydride [16]. Accordingly, the alkene group of maleic anhydride was protected through a Diels-Alder reaction with furan providing the furan-maleic anhydride cycloadduct 14, which subsequently undergoes a sequence of Wittig and retro Diels-Alder reactions to give the (2*E*)-ethyl 2-(5-oxofuran-2(5*H*)-ylidene)acetate 15 in high global yield (80% three steps). Finally, the intermediate 15, by reaction with hydrazine in ethanol, was converted into pyridazinone 16 in moderate yield (52%).

Once compound 16 was obtained, the different coumarin cores were constructed by condensing heteroaryl ester 16 with several methyl or methoxy substituted *o*-hydroxybenzaldehydes (17a–f) (Fig. 3). The reaction was performed in isopropyl alcohol at reflux for 5 h in the presence of piperidine giving rise to the intermediates 18a–f of hybrid structure coumarin-pyridazinone in good yields (69–91%).

Finally, compounds 18 were converted to the bromides 9a–f by refluxing with POBr₃ in toluene (42–63% yield). Likewise, heating of compounds 18 with an excess of POCl₃ led to the chlorides 10a–f (59–70% yield). Chloro derivatives 10 were subsequently treated with a 25% wt solution of NaOCH₃ in methanol at reflux to afford the methoxy analogues 11a–f (65–81% yield) (Scheme 2).

2.2. Monoamine oxidase inhibition studies

The biological study of newly synthesized compounds 9–11 on hMAO activity was carried out by measuring their effects on the production of hydrogen peroxide (H₂O₂) from *p*-tyramine, a common substrate for hMAO-A and hMAO-B, using the two microsomal MAO isoforms, which were obtained from insect cells (BTI-TN-5B1-4) infected with recombinant baculovirus containing cDNA inserts for hMAO-A or hMAO-B, and the Amplex Red MAO assay kit, following a previously described procedure [12,13a]. The target compounds and reference inhibitors (selegiline and iproniazide) were unable to react directly with the Amplex Red reagent, which indicates that these drugs do not interfere with the measurements. In addition, the control activity of hMAO-A and hMAO-B was performed using *p*-tyramine as the common substrate and adjusting the enzyme concentrations to catalyze the oxidation to *p*-hydroxyphenylacetaldehyde at a rate of 165 ± 2 pmol/min (*n* = 20).

The results of the hMAO-A and hMAO-B inhibition studies for compounds 9a–f, 10a–f and 11a–f, as well as the MAO-B selectivity index (SI hMAO-B = [IC₅₀(hMAO-A)]/[IC₅₀(hMAO-B)]), were displayed on Table 1. Enzymatic studies revealed that seventeen of eighteen tested compounds are selective inhibitors of hMAO-B at micromolar or sub-micromolar concentrations.

We observed that a halogen atom (chlorine or bromine) at C6 of the pyridazine ring seems to be better for the activity than a methoxy group, in particular if it was combined with a small substituent (methoxy or methyl) at C6 or C7 of the coumarin core. In addition, a methyl group at C8 seems to be tolerated; however, a methoxy group at this position decreases the MAO-B activity and selectivity in all cases.

Two of the most active compounds of these series are the pyridazinylicoumarins 9b and 9d, with IC₅₀ values against hMAO-B of 0.75 and 0.56 μM, respectively. Both compounds are substituted in

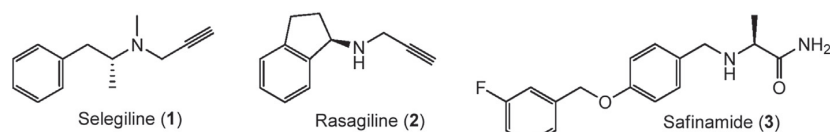


Fig. 1. Structure of reference hMAO-B inhibitors.

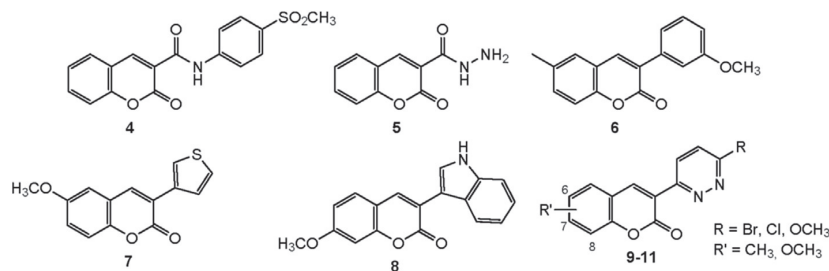
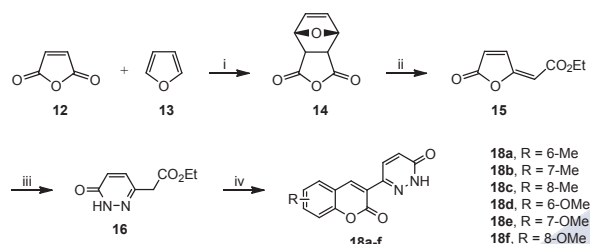


Fig. 2. Structure of several 3-substituted coumarins as MAO-B inhibitors (compounds **4–8**) and general structure of the novel analogues with pyridazine scaffold (compounds **9–11**).



Scheme 1. Reagents and conditions: (i) r.t., 24 h, 98%; (ii) $\text{EtO}_2\text{C}-\text{CH}=\text{PPh}_3$, CHCl_3 , r.t., 24 h then reflux, 24 h, 82%; (iii) $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, EtOH, reflux, 6 h, 52%; (iv) **17a-f**, piperidine, isopropyl alcohol, reflux, 5 h, 76% (**18a**), 84% (**18b**), 77% (**18c**), 91% (**18d**), 69% (**18e**), 87% (**18f**).

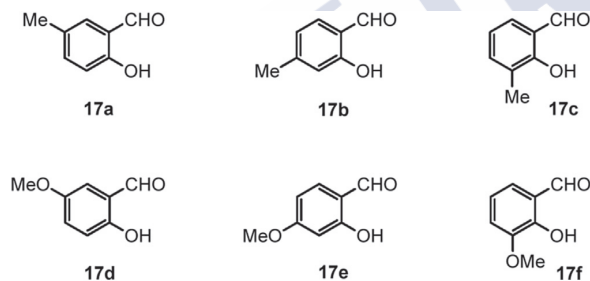
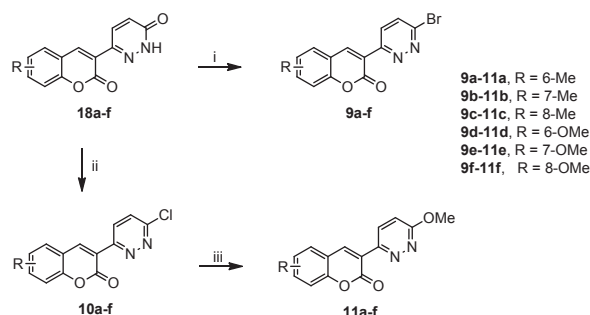


Fig. 3. *o*-Hydroxybenzaldehydes (**17a-f**) used in the target compounds synthesis.



Scheme 2. Reagents and conditions: (i) POBr_3 , toluene, reflux, 8 h, 42% (**9a**), 52% (**9b**), 57% (**9c**), 53% (**9d**), 63% (**9e**), 53% (**9f**); (ii) POCl_3 , reflux, overnight, 67% (**10a**), 70% (**10b**), 59% (**10c**), 61% (**10d**), 63% (**10e**), 65% (**10f**); (iii) NaOCH_3 , MeOH, reflux, overnight, 68% (**11a**), 65% (**11b**), 81% (**11c**), 68% (**11d**), 66% (**11e**), 66% (**11f**).

the 3-pyridazinyl ring with a bromine atom, although they differ in the kind and position of substituent on the coumarin core. Thus, compound **9b** is a C7 methyl derivative while compound **9d** contains a methoxy fragment at C6.

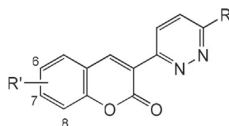
2.3. Reversibility studies of MAO inhibition

Propargylamines, such as selegiline and rasagiline, are irreversible inhibitors of hMAO-B, since when they bind to the enzyme active centre via a covalent bond between the N-propargyl fragment and FAD. However, inhibitors lacking propargyl or any other reactive group could behave as reversible agents, such as safinamide or isatin. Reversible MAO-B inhibitors, because of their minor pharmacological side effects, can be considered more promising than irreversible ones [17]. Accordingly, reversibility experiments were performed to evaluate the type of inhibition for compounds **9b** and **9d**, the most active compounds in the series (Table 1). An effective dilution method was used and selegiline (irreversible inhibitor) and isatin (reversible inhibitor) were taken as standard drugs [18]. Compounds **9b** and **9d** resulted to be reversible MAO-B inhibitors (Table 2). However, their reversibility degree is lower than that described for isatin.

2.4. Molecular docking study

We carried out molecular docking simulations with Glide [19] in the hMAO-B to determine the hypothetical binding mode for the compounds and study the key interactions with the enzyme. The crystallized structure selected to run the docking calculations was 2V60 (PDB code) [20] with the hMAO-B co-crystallized with a coumarin (c17) in the pocket. Details of the docking protocol and validation can be found in Experimental Protocols section and in previous studies described by our group [12b,21].

The novel compounds positioned the coumarin scaffold toward the FAD cofactor and the pyridazine ring toward the hydrophobic entrance cavity. Fig. 4a shows the binding mode extracted from docking for compound **9d**, the most potent compound in these series. For comparative purposes, co-crystallized coumarin c17 is also shown in Fig. 4a. In compound **9d** the α -benzopyrone system orientates the oxygen atoms towards the bottom of the pocket, so that the carbonyl oxygen establishes a hydrogen bond with the residue Cys172 (see Fig. 4b). In addition, important π - π stacking interactions between the benzopyrone moiety and phenyl ring of the residue Tyr326 stabilize the complex. We have found similar poses for compounds **9e** and **9f** with methoxy groups at C7 and C8 position of the coumarin scaffold, respectively (see Fig. 4c). However, both compounds (**9e** and **9f**) have shown lower hMAO-B inhibitory activity compared to compound **9d**. Binding modes found for these compounds showed the coumarin ring slightly shifted towards the FAD region and did not yield the hydrogen

Table 1IC₅₀ values for compounds **9a–f**, **10a–f**, **11a–f** and reference inhibitors on the enzymatic activity of hMAO-A and hMAO-B.^a

Compound	R	R'	IC ₅₀ hMAO-A (μM) ^a	IC ₅₀ hMAO-B (μM)	SI hMAO-B ^c
9a	Br	CH ₃ (6)	*	2.16 ± 0.15	>46.3
9b	Br	CH ₃ (7)	*	0.75 ± 0.17	>133.3
9c	Br	CH ₃ (8)	*	2.64 ± 0.18	>37.9
9d	Br	OCH ₃ (6)	*	0.56 ± 0.04	>178.6
9e	Br	OCH ₃ (7)	*	3.05 ± 0.20	>32.8
9f	Br	OCH ₃ (8)	*	12.85 ± 0.86	>7.8
10a	Cl	CH ₃ (6)	*	13.54 ± 0.91	>7.4
10b	Cl	CH ₃ (7)	*	2.51 ± 0.17	>39.8
10c	Cl	CH ₃ (8)	*	22.71 ± 1.52	>4.4
10d	Cl	OCH ₃ (6)	*	8.80 ± 0.59	>11.4
10e	Cl	OCH ₃ (7)	*	19.17 ± 1.20	>5.2
10f	Cl	OCH ₃ (8)	*	30.11 ± 2.02	>3.3
11a	OCH ₃	CH ₃ (6)	*	17.62 ± 1.18	>5.7
11b	OCH ₃	CH ₃ (7)	*	13.50 ± 0.91	>7.4
11c	OCH ₃	CH ₃ (8)	*	5.35 ± 0.36	>18.7
11d	OCH ₃	OCH ₃ (6)	*	11.10 ± 0.74	>9.0
11e	OCH ₃	OCH ₃ (7)	*	**	—
11f	OCH ₃	OCH ₃ (8)	*	*	—
Selegiline	—	—	68.73 ± 4.21 ^b	0.017 ± 0.0019	4043
lproniazide	—	—	6.56 ± 0.76	7.54 ± 0.36	0.87

^aInactive at 100 μM (highest concentration tested). At higher concentrations the compounds precipitate.^{**} At 100 μM inhibits enzymatic activity by approximately 45–50%.^a Values are expressed as the mean ± standard error of the mean from three experiments (n = 3).^b Level of statistical significance: P < 0.01 versus the corresponding IC₅₀ values obtained against MAO-B, as determined by ANOVA/Dunnett's.^c Values obtained under assumption n the highest concentration tested (100 μM).**Table 2**Reversibility results of hMAO-B inhibition for derivatives **9b**, **9d**, and reference inhibitors.

Compound	R	R'	Slope (AUF/t)[%] ^a
9b	Br	CH ₃ (7)	37.58 ± 2.6
9d	Br	OCH ₃ (6)	54.64 ± 4.0
Selegiline	—	—	12.73 ± 1.85
Isatin	—	—	88.63 ± 5.90

^a Values represent the mean ± SEM of n = 4 experiments relative to control; data show recovery of hMAO-B activity after dilution.

bond with the residue Cys172.

We also calculated the interaction between the residues in the hMAO-B pocket and compounds **9d**, **9e** and **9f** (see Fig. 4d). The residue interaction is calculated as the sum of the terms of Coulomb, van der Waals and hydrogen bonding. According to these calculations, there are some important residues in ligand recognition, such as Phe168, Leu171, Cys172, Ile198, Ile199 and Tyr326. The three analyzed compounds showed a similar interaction profile, although compound **9d** yielded a higher contribution with residue Cys172 compared to compounds **9e** and **9f**. Moreover, methoxy substituent in the described poses for compounds **9e** and **9f** would cause the disruption of the H-bonding network established by two water molecules in the crystallized hMAO-B pocket (HOH1309 and HOH1351). This displacement of water molecules could have effect on binding thermodynamics (see Fig. 5a showing the superposition of ligand **9f** and two co-crystallized water molecules in the pocket).

Compounds **9a**, **9b** and **9c** with a methyl substituent at C6, C7 and C8 position of the benzopyrone moiety, respectively, showed also good binding affinities. Their binding modes are in agreement with the poses described for **9d**. In addition, a hydrogen bond with

the residue Cys172 is also preserved in compound **9b**. However, pose described for compound **9c** did not yield any hydrogen bond and the coumarin ring is slightly shifted toward the FAD region (see Fig. 5b). This fact could contribute in the reduction of hMAO-B inhibitory activity shown by **9c** compared to **9b**. Residue interaction scores for these last three compounds are provided in Fig. S1 of the Supporting Information.

We have also calculated the hydrophobic/hydrophilic surface generated by the hMAO-B (see Fig. 5c). This surface shows favored hydrophobic and hydrophilic regions in the pocket that can help to explain the ligand binding modes. The bromine atom in compound **9b** is placed in the hydrophobic region, in the entrance cavity. Likewise, placement of the C7-methyl substituent shows a good accommodation inside the hydrophobic surface, which can contribute to its activity (IC₅₀ = 0.75 μM). As described previously, compounds **9b** and **9c** placed the methyl substituent in a region where the crystal structure contains a water molecule (HOH1351) that must be displaced for the described binding modes to occur (see Fig. S2 of the Supporting Information). The shift of water molecules could positively or negatively influence the ligand binding. This water molecule participates in the H-bond network with other waters although it does not establish H-bonds with the protein. Moreover, the cited water molecule is not present in the ligand-protein interaction described in alternative hMAO-B crystal structures, such as 1OJ9, 2BK3 or 2V5Z [22].

On the other hand, compounds with chlorine and methoxy substituents at position C6 of the pyridazine ring showed a similar binding mode as described previously (see Fig. S3 of the Supporting Information). In the same manner as bromine in compound **9d**, chlorine atom and methoxy group are placed in the hydrophobic region of the active centre (see Fig. 5c with the hMAO-B

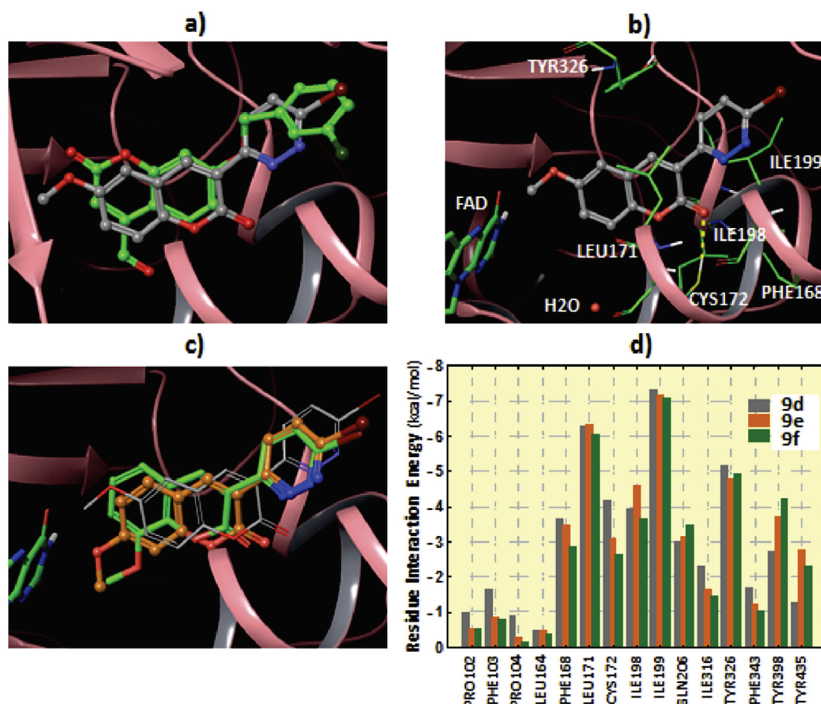


Fig. 4. a) Comparison between the co-crystallized coumarin c17 and the hypothetical binding mode for compound **9d** extracted from the docking simulations in the hMAO-B (for clarity, protein ribbon has been partially omitted). b) Binding mode extracted for compound **9d** along with important hMAO-B residues for the interaction. Hydrogen bond is represented in yellow color. c) Poses extracted from docking for compounds **9e** and **9f** inside the hMAO-B. For comparative purposes, **9d** is also shown (**9d** in grey carbons, **9e** in orange and **9f** in green carbons). d) Residue interaction scores for compounds **9d**, **9e** and **9f** (selected residues in a distance of 3 Å from the crystallized ligand). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

hydrophobic/hydrophilic surface). The lower hydrophobic nature showed by chlorine atom [23] could be a key factor to explain the slight reduction in hMAO-B affinity (IC_{50} values are 0.75 and 2.51 μ M for compounds **9b** and **10b** respectively).

In addition, binding modes described for the new 3-pyridazinylcoumarins are in agreement with previous results shown by molecular docking studies performed for 3-phenylcoumarins, as well as with the fact that a small and hydrophobic substituent in the 3-phenyl ring yielded good results in hMAO-B inhibition and selectivity [12a–b,20]. Our results corroborated the ability of the compounds to interact with the residue Ile199. This fact could modify the disposition of the residue Ile199 and preserve an open conformation in order to make both entrance and substrate cavities join together, which is determinant for the selective MAO-B inhibition when the molecule is suitable of binding to the whole active site [24]. Moreover, isoenzyme A and B present in the pocket some differences in residue composition that can affect selectivity. Additionally, the presence of different water molecules in their pockets can have an important impact in ligand binding and complex formation [12a,25].

2.5. Cytotoxicity studies

The cytotoxic effects of two concentrations (20 and 10 μ M) of compounds **9–11** were evaluated by using the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y because of their similarity to dopaminergic neurons. Compounds were incubated at 20 μ M or 10 μ M concentration and maintained for 24 h period in cell culture. Afterward, the percentage of cell viability was measured as MTT reduction [26].

As depicted in Fig. 6, only compound **11f** (at 20 μ M concentration) significantly decreased the viability of SH-SY5Y cells (Fig. 6a). However for a lower concentration (10 μ M), all the compounds resulted well tolerated by the cells (Fig. 6b).

Considering the IC_{50} values obtained for MAOI-B activity, these results justify the interest of these compounds.

2.6. Prediction of ADME properties and BBB permeability

Theoretical calculations were also performed using Molispiration property program [27] to predict some physicochemical and ADME (absorption, distribution, metabolism and excretion) parameters of the target compounds and compare with reference inhibitors. The values of predicted parameters, including lipophilicity, expressed as log P, molecular weight (MW), topological polar surface area (TPSA), number of hydrogen acceptors (nON), number of hydrogen bond donors (nOHNH) and molecular volume, are presented in Table 3. According to these data, all designed compounds (**9–11**) follow the Lipinski's rule without causing any violation [28], which supposes important information about the potential drug-likeness of these new 3-pyridazinylcoumarins. In addition, ability of compounds **9–11** to cross the blood-brain barrier (BBB, +/–) was also predicted by using a CBligand-BBB predictor program [29]. This program uses two different algorithms AdaBoost and SVM combined with four different fingerprints, providing predictor scores higher than 0 if the analyzed compound can pass the BBB (BBB+). As it was detailed in Table 3, all compounds were predicted as BBB (+), which is essential for MAO inhibition in brain.

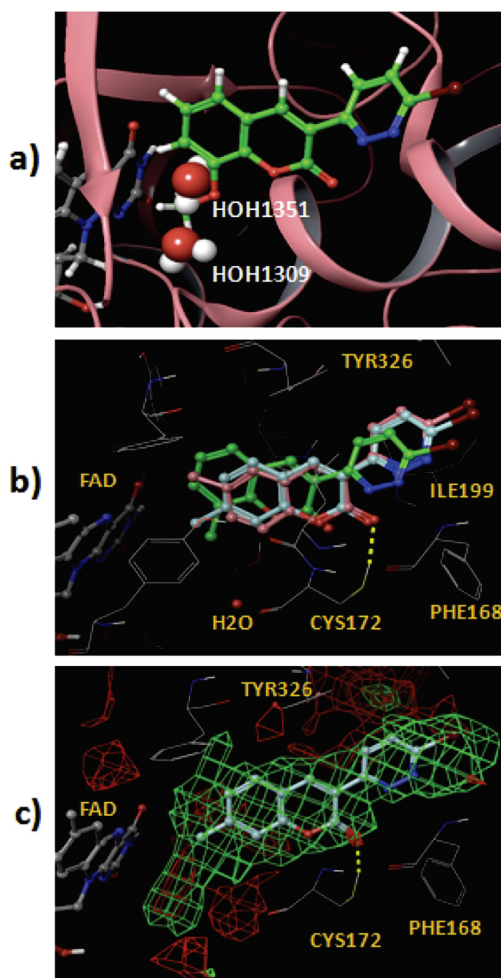


Fig. 5. a) Compounds with methoxy groups at position 7 and 8 of the coumarin must displace two crystallized water molecules to adopt the hypothetical binding mode (superposition of compound **9f** and co-crystallized waters HOH1351 and HOH1309). b) Poses extracted from docking for compounds **9a** (pink carbons), **9b** (turquoise carbons) and **9c** (green carbons). c) Hydrophobic/hydrophilic surface displayed in the hMAO-B pocket (green color for hydrophobic and red color for hydrophilic areas). Compound **9b** is displayed inside the pocket. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3. Conclusions

Eighteen 3-pyridazinylcoumarins were synthesized in good yield following a multistep approach based on Knoevenagel reaction and using as key intermediate pyridazinone **16**, which was obtained from maleic anhydride and furan. The novel compounds of hybrid structure coumarin-pyridazine, whose design was based on bioisosteric replacement benzene/pyridazine, display potent, selective and reversible effects on MAO-B activity in the micromolar or submicromolar range, in which are devoid of cytotoxic activity, being compounds **9b** ($IC_{50} = 0.75 \mu M$) and **9d** ($IC_{50} = 0.56 \mu M$), both substituted with a bromine atom in the 3-pyridazinyl ring and a methyl or methoxy group at C7 or C6, respectively, the most active compounds of these series, displaying good theoretical ADME properties and BBB penetration.

Molecular docking yielded binding modes for the compounds

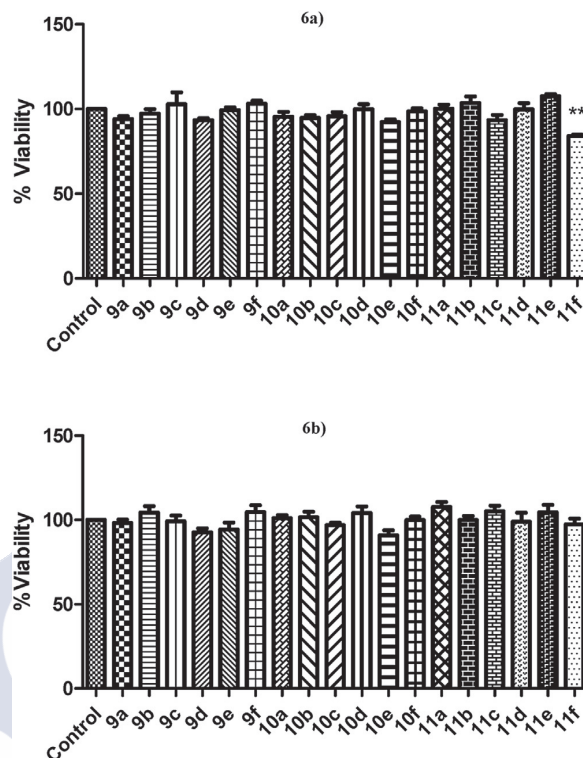


Fig. 6. Cytotoxic activity after 24 h incubation with compounds **9–11** at 20 μM concentration (6a) or 10 μM concentration (6b) on SH-SY5Y cells. Cell viability was measured as MTT reduction and data were normalized as % of control. Results are expressed as mean \pm S.E.M from at least 5 different cultures. ** $P \leq 0.05$ versus the control group treated with DMSO (1%). Comparisons were performed by one-way ANOVA followed by the Dunnett's test.

Table 3
Calculated physicochemical and ADME parameters and BBB permeability of the target compounds (**9–11**) and reference drugs.

Compound	Log P	MW	TPSA	nON	nOHNH	MV	BBB (\pm)
9a	3.66	317.14	55.99	4	0	226.13	+
9b	3.66	317.14	55.99	4	0	226.13	+
9c	3.63	317.14	55.99	4	0	226.13	+
9d	3.27	333.14	65.23	5	0	235.11	+
9e	3.27	333.14	65.23	5	0	235.11	+
9f	3.24	333.14	65.23	5	0	235.11	+
10a	3.53	272.69	55.99	4	0	221.78	+
10b	3.53	272.69	55.99	4	0	221.78	+
10c	3.50	272.69	55.99	4	0	221.78	+
10d	3.13	288.69	65.23	5	0	230.76	+
10e	3.13	288.69	65.23	5	0	230.76	+
10f	3.11	288.69	65.23	5	0	230.76	+
11a	2.90	268.27	65.23	5	0	233.79	+
11b	2.90	268.27	65.23	5	0	233.79	+
11c	2.88	268.27	65.23	5	0	233.79	+
11d	2.52	284.27	74.46	6	0	242.77	+
11e	2.51	284.27	74.46	6	0	242.77	+
11f	2.49	284.27	74.47	6	0	242.77	+
Selegiline	2.64	187.29	3.24	1	0	202.64	+
Iproniazide	0.27	179.22	54.02	4	2	173.62	+

Log P: log octanol/water partition coefficient; MW: molecular weight; TPSA: topological polar surface area; nON: number of hydrogen acceptors; nOHNH: number of hydrogen donors; MV: molecular volume; BBB(\pm): blood brain barrier permeability.

with the coumarin nucleus oriented toward the FAD and the

pyridazine ring toward the hydrophobic entrance cavity of the hMAOI-B. Our simulations led us to explain the MAOI-B selectivity and rationalize the structure-activity relationships (SARs) for the studied series and provided important insights for the rational drug design of new derivatives. In addition, SARs suggested that, although the bioisosteric substitution benzene-pyridazine decreases the MAOI-B activity and selectivity, both effects seem to be attenuated by the inclusion in the pyridazine core of groups with adequate steric and hydrophobic parameters. All these results proved the potential of this chemical family as a promising lead for the hMAOI-B activity.

4. Experimental protocols

4.1. General methods and materials

All starting materials and common laboratory chemicals were purchased from commercial sources and used without further purification. All solvents were distilled and dried according to standard procedures. Melting points were determined in capillary tubes in a Stuart Scientific apparatus. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker ARX400 instrument, using TMS as internal standard [chemical shifts (δ) in ppm, J in Hz]. The assignment of the signals was performed by COSY, DEPT, HSQC experiments. High resolution mass spectra were recorded using a Bruker microTOF focus spectrometer. Silica gel (Merck 60, 230–400 mesh) was used for flash chromatography (FC). Analytical TLC was performed on plates precoated with silica gel (Merck 60 F254, 0.25 mm). Synthesis of (2*E*)-ethyl 2-(5-oxofuran-2(5*H*)-ylidene)acetate **15**, which was performed adapting experimental protocols previously described [16], as well as its analytic and spectroscopic data were described in the supporting information.

4.2. Ethyl 2-(6-oxo-1,6-dihydropyridazin-3-yl)acetate (**16**)

To a solution of compound **15** (6.03 g, 35.9 mmol) in ethanol (25 mL) was added hydrazine monohydrate (2.6 mL, 53.8 mmol) and the reaction mixture was stirred under reflux for 6 h. The solvent was removed and the residue was purified by column chromatography on silica gel (1% MeOH/EtOAc) to afford **16** (3.4 g, 52%) as a white solid. R_f = 0.3 (5% MeOH/EtOAc); m.p. = 108–109 °C; ^1H NMR (CDCl_3): δ = 10.92 (s, 1H, NH), 7.31 (d, 1H, J = 9.8 Hz, H4), 6.95 (d, 1H, J = 9.8 Hz, H5), 4.20 (q, 2H, J = 7.1 Hz, CH_2CH_3), 3.64 (s, 2H, CH_2), 1.28 (t, 3H, J = 7.1 Hz, CH_3); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ = 169.6 (CO_2Et), 162.1 (C6), 142.4 (C3), 134.6 (C4), 129.9 (C5), 61.5 (CH_2CH_3), 40.0 (CH_2), 14.1 (CH_3); HRMS (ESI): m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calcd for $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3$, 183.07642; found 183.07604.

4.3. General procedure for the synthesis of compounds **18a-f**

To a solution of the pyridazinone **16** (0.90 mmol) in isopropyl alcohol (8 mL) was added the corresponding *o*-hydroxybenzaldehyde **17a-f** (1.62 mmol) and piperidine (0.99 mmol). The reaction mixture was stirred at reflux for 5 h and the resulting precipitate was filtered, washed with diethyl ether and dried under vacuum to afford the desired compound.

4.3.1. 6-Methyl-3-(6-oxo-1,6-dihydropyridazin-3-yl)coumarin (**18a**)

The title compound was prepared using 2-hydroxy-5-methylbenzaldehyde (**17a**). White solid; yield 76%; R_f = 0.3 (EtOAc); m.p. = 299–300 °C; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ = 13.35 (s, 1H, NH), 8.30 (s, 1H, H4), 7.85 (d, 1H, J = 9.9 Hz, H4'), 7.61 (d, 1H, J = 1.8 Hz, H5), 7.44 (dd, 1H, J = 8.4, 1.8 Hz, H7), 7.32 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H8), 6.92 (d, 1H, J = 9.9 Hz, H5'), 2.33 (s, 3H, CH_3); ^{13}C

NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ = 160.4 (CO), 159.5 (CO), 151.6 (C8a), 141.6 (C4), 141.0 (C3'), 134.2 (C6), 133.7 (C7), 133.6 (C4'), 128.9, 128.7, 122.3 (C3), 118.7 (C4a), 115.9 (C8), 20.3 (CH_3); HRMS (ESI): m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3$, 255.07642; found 255.07642.

4.3.2. 7-Methyl-3-(6-oxo-1,6-dihydropyridazin-3-yl)coumarin (**18b**)

The title compound was prepared using 2-hydroxy-4-methylbenzaldehyde (**17b**). White solid; yield 84%; R_f = 0.2 (EtOAc); m.p. = 300–301 °C; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ = 13.36 (s, 1H, NH), 8.36 (s, 1H, H4), 7.89 (d, 1H, J = 9.9 Hz, H4'), 7.74 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H5), 7.28 (s, 1H, H8), 7.21 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H6), 6.95 (d, 1H, J = 9.9 Hz, H5'), 2.42 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ = 160.4 (CO), 159.5 (CO), 153.6 (C8a), 143.8 (C7), 141.7 (C4), 141.0 (C3'), 133.6 (C4'), 129.0 (C5), 128.7 (C5'), 126.0 (C6), 121.2 (C3), 116.6 (C4a), 116.1 (C8), 21.4 (CH_3); HRMS (ESI): m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3$, 255.07642; found 255.07657.

4.3.3. 8-Methyl-3-(6-oxo-1,6-dihydropyridazin-3-yl)coumarin (**18c**)

The title compound was prepared using 2-hydroxy-3-methylbenzaldehyde (**17c**). White solid; yield 77%; R_f = 0.2 (EtOAc); m.p. = 285–286 °C; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ = 13.38 (s, 1H, NH), 8.41 (s, 1H, H4), 7.92 (d, 1H, J = 9.9 Hz, H4'), 7.71 (d, 1H, J = 7.5 Hz, H5), 7.55 (d, 1H, J = 7.5 Hz, H7), 7.31 (t, 1H, J = 7.5 Hz, H6), 6.98 (d, 1H, J = 9.9 Hz, H5'), 2.41 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ = 160.4 (CO), 159.4 (CO), 151.7 (C8a), 142.0 (C4), 140.9 (C3'), 133.8, 133.6, 128.8 (C5'), 127.1 (C5), 125.0 (C8), 124.5 (C6), 122.1 (C3), 118.7 (C4a), 14.9 (CH_3); HRMS (ESI): m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3$, 255.07642; found 255.07702.

4.3.4. 6-Methoxy-3-(6-oxo-1,6-dihydropyridazin-3-yl)coumarin (**18d**)

The title compound was prepared using 2-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde (**17d**). White solid; yield 91%; R_f = 0.2 (EtOAc); m.p. = 278–279 °C; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ = 13.38 (s, 1H, NH), 8.37 (s, 1H, H4), 7.91 (d, 1H, J = 9.9 Hz, H4'), 7.44 (d, 1H, J = 2.9 Hz, H5), 7.41 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H8), 7.25 (dd, 1H, J = 9.1, 2.9 Hz, H7), 6.96 (d, 1H, J = 9.9 Hz, H5'), 3.80 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ = 160.4 (CO), 159.5 (CO), 155.8 (C6), 147.9 (C8a), 141.5 (C4), 140.9 (C3'), 133.6 (C4'), 128.7 (C5'), 122.6 (C3), 120.3 (C7), 119.5 (C4a), 117.2 (C8), 111.3 (C5), 55.8 (CH_3); HRMS (ESI): m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_4$, 271.07133; found 271.07120.

4.3.5. 7-Methoxy-3-(6-oxo-1,6-dihydropyridazin-3-yl)coumarin (**18e**)

The title compound was prepared using 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (**17e**). White solid; yield 69%; R_f = 0.2 (EtOAc); m.p. = 301–302 °C; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ = 13.33 (s, 1H, NH), 8.35 (s, 1H, H4), 7.89 (d, 1H, J = 9.9 Hz, H4'), 7.78 (d, 1H, J = 8.7 Hz, H5), 7.05 (d, 1H, J = 2.3 Hz, H8), 6.99 (dd, 1H, J = 8.7, 2.3 Hz, H6), 6.94 (d, 1H, J = 9.9 Hz, H5'), 3.87 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ = 163.2 (C7), 160.4 (CO), 159.6 (CO), 155.5 (C8a), 141.9 (C4), 141.1 (C3'), 133.6 (C4'), 130.5 (C5), 128.7 (C5'), 118.6 (C3), 113.1 (C6), 112.6 (C4a), 100.4 (C8), 56.1 (CH_3); HRMS (ESI): m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_4$, 271.07133; found 271.07168.

4.3.6. 8-Methoxy-3-(6-oxo-1,6-dihydropyridazin-3-yl)coumarin (**18f**)

The title compound was prepared using 2-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (**17f**). White solid; yield 87%; R_f = 0.2 (EtOAc); m.p. = 307–308 °C; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ = 13.38 (s, 1H, NH), 8.38 (s, 1H, H4), 7.91 (d, 1H, J = 9.9 Hz, H4'), 7.41 (dd, 1H, J = 7.1, 2.1 Hz, H5), 7.38–7.27 (m, 2H, H6, H7), 6.96 (d, 1H, J = 9.9 Hz, H5'), 3.92 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ = 160.4 (CO), 159.1 (CO),

146.3 (C8), 142.7 (C8a), 141.8 (C4), 140.8 (C3'), 133.6 (C4'), 128.7 (C5'), 124.9 (C6), 122.5 (C3), 120.4 (C5), 119.5 (C4a), 114.8 (C7), 56.2 (CH₃); HRMS (ESI): m/z [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₁₁N₂O₄, 271.07133; found 271.07043.

4.4. General procedure for the synthesis of compounds **9a-f**

To a solution of compound **18a-f** (0.08 mmol) in toluene (4 mL) was added phosphorous oxybromide (2.80 mmol) and the reaction mixture was stirred at reflux for 8 h. After the solvent was removed, H₂O (5 mL) was added and the resulting precipitate was filtered, washed with diethyl ether and dried under vacuum to afford the proper compound.

4.4.1. 3-(6-Bromopyridazin-3-yl)-6-methylcoumarin (**9a**)

Brown solid; yield 42%; R_f = 0.5 (50% EtOAc/hexane); m.p. = 201–202 °C; ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.95 (s, 1H, H4), 8.48 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H4'), 7.73 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H5'), 7.50–7.42 (m, 2H, H5, H7), 7.31 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H8), 2.45 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 160.3 (C2), 154.7 (C3'), 152.7 (C8a), 147.7 (C6'), 144.2 (C4), 135.1 (C6), 134.7 (C7), 131.4 (C5'), 129.3, 129.0, 121.5 (C3), 119.0 (C4a), 116.5 (C8), 21.0 (CH₃); HRMS (ESI): m/z [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₁₀BrN₂O₂, 316.99202; found 316.99154.

4.4.2. 3-(6-Bromopyridazin-3-yl)-7-methylcoumarin (**9b**)

Brown solid; yield 52%; R_f = 0.5 (50% EtOAc/hexane); m.p. = 211–212 °C; ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.97 (s, 1H, H4), 8.48 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H4'), 7.72 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H5'), 7.58 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H5), 7.22 (s, 1H, H8), 7.19 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H6), 2.51 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 160.3 (C2), 154.7 (C3', C8a), 147.5 (C6'), 145.3 (C7), 144.2 (C4), 131.4 (C5'), 129.3 (C5), 128.9 (C4'), 126.6 (C6), 120.5 (C3), 116.9 (C4a, C8), 22.2 (CH₃); HRMS (ESI): m/z [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₁₀BrN₂O₂, 316.99202; found 316.99207.

4.4.3. 3-(6-Bromopyridazin-3-yl)-8-methylcoumarin (**9c**)

Brown solid; yield 57%; R_f = 0.6 (50% EtOAc/hexane); m.p. = 199–200 °C; ¹H NMR (CDCl₃): δ = 9.01 (s, 1H, H4), 8.51 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H4'), 7.75 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H5'), 7.55 (d, 1H, J = 7.6 Hz, H5), 7.49 (d, 1H, J = 7.6 Hz, H7), 7.27 (t, 1H, J = 7.6 Hz, H6), 2.52 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 160.2 (C2), 154.6 (C3'), 153.0 (C8a), 147.6 (C6'), 144.8 (C4), 134.9 (C7), 131.6 (C5'), 129.2 (C4'), 127.5 (C5), 126.3 (C8), 124.9 (C6), 121.0 (C3), 119.0 (C4a), 15.5 (CH₃); HRMS (ESI): m/z [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₁₀BrN₂O₂, 316.99202; found 316.99278.

4.4.4. 3-(6-Bromopyridazin-3-yl)-6-methoxycoumarin (**9d**)

Brown solid; yield 53%; R_f = 0.5 (50% EtOAc/hexane); m.p. = 203–204 °C; ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.96 (s, 1H, H4), 8.50 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H4'), 7.74 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H5'), 7.33 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H8), 7.21 (dd, 1H, J = 9.1, 2.9 Hz, H7), 7.10 (d, 1H, J = 2.9 Hz, H5), 3.88 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 160.2 (C2), 156.6 (C6), 154.5 (C3'), 149.1 (C8a), 147.7 (C6'), 144.1 (C4), 131.5 (C5'), 129.1 (C4'), 121.9 (C7), 121.7 (C3), 119.5 (C4a), 117.8 (C8), 110.7 (C5), 56.1 (CH₃); HRMS (ESI): m/z [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₁₀BrN₂O₃, 332.98693; found 332.98756.

4.4.5. 3-(6-Bromopyridazin-3-yl)-7-methoxycoumarin (**9e**)

Brown solid; yield 63%; R_f = 0.5 (50% EtOAc/hexane); m.p. = 222–223 °C; ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.97 (s, 1H, H4), 8.48 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H4'), 7.71 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H5'), 7.60 (d, 1H, J = 8.7 Hz, H5), 6.93 (dd, 1H, J = 8.7, 2.4 Hz, H6), 6.87 (d, 1H, J = 2.4 Hz, H8), 3.92 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 164.5 (C7), 160.3 (C2), 156.7 (C8a), 154.8 (C3'), 147.2 (C6'), 144.3 (C4), 131.4 (C5'), 130.8 (C5), 128.7 (C4'), 117.8 (C3), 113.8 (C6), 113.0 (C4a), 100.5 (C8), 56.1 (CH₃); HRMS (ESI): m/z [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₁₀BrN₂O₃, 332.98693; found 332.98794.

4.4.6. 3-(6-Bromopyridazin-3-yl)-8-methoxycoumarin (**9f**)

Brown solid; yield 53%; R_f = 0.5 (50% EtOAc/hexane); m.p. = 198–199 °C; ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.99 (s, 1H, H4), 8.50 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H4'), 7.73 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H5'), 7.34–7.26 (m, 2H, H5, H6), 7.18 (dd, 1H, J = 7.3, 2.4 Hz, H7), 4.01 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 159.5 (C2), 154.5 (C3'), 147.7 (C6'), 147.2 (C8), 144.4 (C8a), 144.2 (C4), 131.6 (C5'), 129.1 (C4'), 125.1 (C6), 121.8 (C3), 120.9 (C5), 119.8 (C4a), 115.1 (C7), 56.5 (CH₃); HRMS (ESI): m/z [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₁₀BrN₂O₃, 332.98693; found 332.98617.

4.5. General procedure for the synthesis of compounds **10a-f**

Compound **18a-f** (0.36 mmol) was treated with an excess of phosphorus oxychloride (2 mL). The reaction mixture was stirred overnight at reflux, then carefully poured onto ice (\approx 1 mL), and finally rendered alkaline with a 25% wt. aqueous solution of NH₃. The resulting precipitate was filtered, washed with water and dried under vacuum to afford the proper compound.

4.5.1. 3-(6-Chloropyridazin-3-yl)-6-methylcoumarin (**10a**)

Brown solid; yield 67%; R_f = 0.6 (50% EtOAc/hexane); m.p. = 187–188 °C; ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.95 (s, 1H, H4), 8.59 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H4'), 7.59 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H5'), 7.51–7.40 (m, 2H, H5, H7), 7.31 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H8), 2.45 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 160.3 (C2), 156.3 (C6'), 154.4 (C3'), 152.8 (C8a), 144.2 (C4), 135.1 (C6), 134.7 (C7), 129.3, 129.2, 128.1 (C5'), 121.5 (C3), 119.0 (C4a), 116.5 (C8), 21.0 (CH₃); HRMS (ESI): m/z [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₁₀ClN₂O₂, 273.04253; found 273.04322.

4.5.2. 3-(6-Chloropyridazin-3-yl)-7-methylcoumarin (**10b**)

Brown solid; yield 70%; R_f = 0.6 (50% EtOAc/hexane); m.p. = 217–218 °C; ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.97 (s, 1H, H4), 8.58 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H4'), 7.60–7.56 (m, 2H, H5', H5), 7.24–7.13 (m, 2H, H6, H8), 2.51 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 160.4 (C2), 156.1 (C6'), 154.7, 154.5, 145.3 (C7), 144.2 (C4), 129.3, 129.2, 128.0 (C5'), 126.6 (C6), 120.4 (C3), 116.9 (C8), 116.8 (C4a), 22.2 (CH₃); HRMS (ESI): m/z [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₁₀ClN₂O₂, 273.04253; found 273.04294.

4.5.3. 3-(6-Chloropyridazin-3-yl)-8-methylcoumarin (**10c**)

Brown solid; yield 59%; R_f = 0.6 (50% EtOAc/hexane); m.p. = 197–198 °C; ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.99 (s, 1H, H4), 8.59 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H4'), 7.60 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H5'), 7.54 (d, 1H, J = 7.6 Hz, H5), 7.49 (d, 1H, J = 7.6 Hz, H7), 7.27 (t, 1H, J = 7.6 Hz, H6), 2.52 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 160.3 (C2), 156.3 (C6'), 154.5 (C3'), 152.9 (C8a), 144.6 (C4), 134.8 (C7), 129.3 (C4'), 128.1 (C5'), 127.4 (C5), 126.3 (C8), 124.8 (C6), 121.2 (C3), 119.0 (C4a), 15.6 (CH₃); HRMS (ESI): m/z [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₁₀ClN₂O₂, 273.04253; found 273.04334.

4.5.4. 3-(6-Chloropyridazin-3-yl)-6-methoxycoumarin (**10d**)

Brown solid; yield 61%; R_f = 0.4 (50% EtOAc/hexane); m.p. = 224–225 °C; ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.97 (s, 1H, H4), 8.60 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H4'), 7.60 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H5'), 7.35 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H8), 7.23 (dd, 1H, J = 9.1, 2.9 Hz, H7), 7.10 (d, 1H, J = 2.9 Hz, H5), 3.89 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 160.2 (C2), 156.6 (C6), 156.3 (C6'), 154.4 (C3'), 149.1 (C8a), 144.0 (C4), 129.3 (C4'), 128.1 (C5'), 121.9 (C3), 121.8 (C7), 119.5 (C4a), 117.9 (C8), 110.8 (C5), 56.1 (CH₃); HRMS (ESI): m/z [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₁₀ClN₂O₃, 289.03745; found 289.03729.

4.5.5. 3-(6-Chloropyridazin-3-yl)-7-methoxycoumarin (**10e**)

Brown solid; yield 63%; R_f = 0.5 (50% EtOAc/hexane); m.p. = 243–244 °C; ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.98 (s, 1H, H4), 8.58 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H4'), 7.60 (d, 1H, J = 8.7 Hz, H5), 7.57 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H5'), 6.94 (dd, 1H, J = 8.7, 2.4 Hz, H6), 6.89 (d, 1H, J = 2.4 Hz, H8),

3.93 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 164.4 (C7), 160.4 (C2), 156.6, 155.9, 154.6 (C3'), 144.3 (C4), 130.7 (C5), 129.0 (C4'), 128.0 (C5'), 117.8 (C3), 113.8 (C6), 113.0 (C4a), 100.5 (C8), 56.1 (CH₃); HRMS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₁₀ClN₂O₃, 289.03745; found 289.03678.

4.5.6. 3-(6-Chloropyridazin-3-yl)-8-methoxycoumarin (**10f**)

Brown solid; yield 65%; *R_f* = 0.4 (50% EtOAc/hexane); m.p. = 230–231 °C; ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.98 (s, 1H, H4), 8.61 (d, 1H, *J* = 9.1 Hz, H4'), 7.60 (d, 1H, *J* = 9.1 Hz, H5'), 7.34–7.23 (m, 2H, H5, H6), 7.18 (dd, *J* = 7.3, 2.1 Hz, H7), 4.01 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 159.6 (C2), 156.3 (C6'), 154.3 (C3'), 147.1 (C8), 144.4 (C4), 144.1 (C8a), 129.4 (C4'), 128.1 (C5'), 125.1 (C6), 121.8 (C3), 120.8 (C5), 119.8 (C4a), 115.0 (C7), 56.5 (CH₃); HRMS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₁₀ClN₂O₃, 289.03745; found 289.03759.

4.6. General procedure for the synthesis of compounds **11a–f**

To a solution of compound **10a–f** (0.10 mmol) in methanol (5 mL) was added a 25% wt. solution of NaOCH₃ in methanol (0.15 mmol) and the reaction mixture was stirred under reflux overnight. After the solvent was removed, the residue was purified by column chromatography on silica gel (20% EtOAc/hexane for **11a–c**; 30% EtOAc/hexane for **11d–f**) to afford the desired compound.

4.6.1. 3-(6-Methoxypyridazin-3-yl)-6-methylcoumarin (**11a**)

White solid; yield 68%; *R_f* = 0.3 (2:1 hexane/EtOAc); m.p. = 195–196 °C; ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.78 (s, 1H, H4), 8.43 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H4'), 7.43–7.37 (m, 2H, H5, H7), 7.29 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H8), 7.05 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H5'), 4.19 (s, 3H, CH₃O), 2.44 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 164.8 (C6'), 160.7 (C2), 152.4 (C8a), 151.3 (C3'), 142.5 (C4), 134.8 (C6), 133.8 (C7), 130.2 (C4'), 128.8 (C5), 122.8 (C3), 119.3 (C4a), 116.8 (C5'), 116.4 (C8), 55.1 (CH₃O), 21.0 (CH₃); HRMS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₅H₁₃N₂O₃, 269.09207; found 269.09201.

4.6.2. 3-(6-Methoxypyridazin-3-yl)-7-methylcoumarin (**11b**)

White solid; yield 65%; *R_f* = 0.3 (2:1 hexane/EtOAc); m.p. = 231–232 °C; ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.80 (s, 1H, H4), 8.42 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H4'), 7.52 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, H5), 7.20 (s, 1H, H8), 7.15 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, H6), 7.05 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H5'), 4.19 (s, 3H, CH₃O), 2.49 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 164.7 (C6'), 160.7 (C2), 154.4 (C8a), 151.3 (C3'), 144.3 (C7), 142.5 (C4), 130.2 (C4'), 128.9 (C5), 126.3 (C6), 121.7 (C3), 117.2 (C4a), 116.8, 116.8, 55.0 (CH₃O), 22.2 (CH₃); HRMS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₅H₁₃N₂O₃, 269.09207; found 269.09201.

4.6.3. 3-(6-Methoxypyridazin-3-yl)-8-methylcoumarin (**11c**)

White solid; yield 81%; *R_f* = 0.3 (2:1 hexane/EtOAc); m.p. = 169–170 °C; ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.82 (s, 1H, H4), 8.44 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H4'), 7.48 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, H5), 7.44 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, H7), 7.23 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz, H6), 7.06 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H5'), 4.19 (s, 3H, CH₃O), 2.51 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 164.8 (C6'), 160.7 (C2), 152.7 (C8a), 151.2 (C3'), 142.9 (C4), 134.0 (C7), 130.2 (C4'), 126.9 (C5), 126.2 (C8), 124.6 (C6), 122.6 (C3), 119.3 (C4a), 116.9 (C5'), 55.1 (CH₃O), 15.6 (CH₃); HRMS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₅H₁₃N₂O₃, 269.09207; found 269.09170.

4.6.4. 6-Methoxy-3-(6-methoxypyridazin-3-yl)coumarin (**11d**)

White solid; yield 68%; *R_f* = 0.2 (2:1 hexane/EtOAc); m.p. = 179–180 °C; ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.77 (s, 1H, H4), 8.43 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H4'), 7.33 (d, 1H, *J* = 9.1 Hz, H8), 7.17 (dd, *J* = 9.1, 2.9 Hz, H7), 7.07–7.02 (m, 2H, H5', H5), 4.19 (s, 3H, 6'-OCH₃), 3.87 (s, 3H, 6-OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 164.8 (C6'), 160.6 (C2), 156.5 (C6), 151.2 (C3'), 148.8 (C8a), 142.3 (C4), 130.3 (C4'), 123.2 (C7), 120.7

(C3), 119.9 (C4a), 117.7 (C8), 116.8 (C5'), 110.7 (C5), 56.0 (6-OCH₃), 55.1 (6'-OCH₃); HRMS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₅H₁₃N₂O₄, 285.08698; found 285.08658.

4.6.5. 7-Methoxy-3-(6-methoxypyridazin-3-yl)coumarin (**11e**)

White solid; yield 66%; *R_f* = 0.2 (2:1 hexane/EtOAc); m.p. = 224–225 °C; ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.79 (s, 1H, H4), 8.41 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H4'), 7.53 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, H5), 7.03 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H5'), 6.90 (dd, 1H, *J* = 8.6, 2.3 Hz, H6), 6.86 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, H8), 4.17 (s, 3H, 6'-OCH₃), 3.90 (s, 3H, 7-OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 164.6 (C6'), 163.7 (C7), 160.8 (C2), 156.3 (C8a), 151.4 (C3'), 142.6 (C4), 130.2 (C5), 130.0 (C4'), 119.3 (C3), 116.8 (C5'), 113.5 (C6), 113.3 (C4a), 100.5 (C8), 56.0 (7-OCH₃), 55.0 (6'-OCH₃); HRMS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₅H₁₃N₂O₄, 285.08698; found 285.08693.

4.6.6. 8-Methoxy-3-(6-methoxypyridazin-3-yl)coumarin (**11f**)

White solid; yield 66%; *R_f* = 0.2 (2:1 hexane/EtOAc); m.p. = 232–233 °C; ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.82 (s, 1H, H4), 8.45 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H4'), 7.32–7.19 (m, 2H, H5, H6), 7.14 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.6 Hz, H7), 7.05 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H5'), 4.19 (s, 3H, 6'-OCH₃), 4.00 (s, 3H, 8-OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 164.7 (C6'), 159.7 (C2), 150.9 (C3'), 147.0 (C8), 143.8 (C8a), 142.6 (C4), 130.2 (C4'), 124.7 (C6), 122.9 (C3), 120.4 (C5), 120.0 (C4a), 116.9 (C5'), 114.2 (C7), 56.3 (8-OCH₃), 55.0 (6'-OCH₃); HRMS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₅H₁₃N₂O₄, 285.08698; found 285.08644.

4.7. Determination of MAO isoforms activity

The effects of the target compounds on enzymatic activity of hMAO isoforms were evaluated by a fluorimetric method and following previously described protocols [12,13a]. Briefly, 0.1 mL of sodium phosphate buffer (0.5 M, pH 7.4) containing the test drugs (novel compounds and reference inhibitors), in various concentrations, and adequate amounts of recombinant hMAO-A or hMAO-B required, adjusted to obtain in our experimental conditions the same reaction velocity that in the control group, that is an oxidation rate of 165 ± 2 pmol of p-tyramine/min (hMAO-A: 1.1 µg protein; specific activity: 150 nmol of p-tyramine oxidized to *p*-hydroxyphenylacetaldehyde/min/mg protein; hMAO-B: 7.5 µg protein; specific activity: 22 nmol of p-tyramine transformed/min/mg protein), were incubated for 15 min at 37 °C in a flat-blackbottom 96-well microtest™ plate, placed in the dark fluorimeter chamber. After this incubation period, the reaction was started by adding (final concentrations) 200 µM Amplex® Red reagent, 1 U/mL horseradish peroxidase and 1 mM p-tyramine. The production of H₂O₂ and, consequently, of resorufin was quantified at 37 °C in a multidetection microplate fluorescence reader (FLX800™, Bio-Tek® Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) based on the fluorescence generated (excitation, 545 nm, emission, 590 nm) over a 15 min period, in which the fluorescence increased linearly.

Control experiments were carried out simultaneously by replacing the test drugs (new compounds and reference inhibitors) with appropriate dilutions of the vehicles. In addition, the possible ability of the above test drugs to modify the fluorescence generated in the reaction mixture due to non-enzymatic inhibition (e.g., for directly reacting with Amplex® Red reagent) was determined by adding these drugs to solutions containing only the Amplex® Red reagent in a sodium phosphate buffer.

The specific fluorescence emission (used to obtain the final results) was calculated after subtraction of the background activity, which was determined from vials containing all components except the hMAO isoforms, which were replaced by a sodium phosphate buffer solution.

MAO activity of the test compounds and reference inhibitors is

expressed as IC_{50} values (concentration of each drug required to produce a 50% decrease on the control value activity of the isoforms MAO). These values were calculated by using the Origin 5.0 software (Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA), from the equations of the lines obtained by linear regression (methods least squares) of the resulting points to represent the log of the molar concentration of the test compound (x axis) versus the percentage inhibition of the control MAO activity achieved with corresponding concentrations of each compound (y axis). This linear regression was performed by using data obtained with 4–6 concentrations of each test compound capable of inhibiting the control enzyme activity of the MAO isoenzymes by between 20 and 80%. Also, the $[IC_{50}(\text{MAO-A})]/[IC_{50}(\text{MAO-B})]$ ratio was calculated as an indicator of the rate of selectivity in the inhibition of both isoforms.

4.8. Reversibility

To evaluate whether compounds **9b** and **9d** are reversible or irreversible hMAO-B inhibitors, a dilution method was used [18]. A 100X concentration of the enzyme used in the above described experiments was incubated with a concentration of inhibitor equivalent to 10-fold the IC_{50} value. After 30 min, the mixture was diluted 100-fold into reaction buffer containing Amplex® Red reagent, horseradish peroxidase and *p*-tyramine and the reaction was monitored for 15 min, following the same procedure previously described for MAO activity assay. Reversible inhibitors show linear progress with a slope equal to $\approx 91\%$ of the slope of the control sample, whereas irreversible inhibition reaches only $\approx 9\%$ of this slope. Control tests were carried out by pre-incubating and diluting the enzyme in the absence of inhibitor.

4.9. Molecular docking

Schrödinger package [19] was used to carry out the docking calculations. The co-crystallized hMAO-B structure (PDB code: 2V60) [20] bound to the coumarin 7-(3-chlorobenzyloxy)-4-carboxaldehydecoumarin (**c17**) was selected for the docking. The crystallized structure was pre-processed with the Protein Preparation Workflow available in the modeling package. This process prepared the protein for the following docking steps and included addition and optimization of hydrogens, cap termini addition, optimization of protonation states of some residues, H-bond network optimization, etc. Only a water molecule that establishes a hydrogen bond between the co-crystallized coumarin and the protein is retained in the pocket for the docking calculations. The ligands database was pre-processed with the LigPrep module [19]. This module generated different tautomers, protonation states ($\text{pH } 7.0 \pm 2.0$) and optimized the structure of each ligand.

A receptor grid was generated and centered in the co-crystallized **c17** coumarin (outer box = 20 Å), with a van der Waals scaling factor of 1.0 and a partial charge cut-off of 0.25. Docking was carried out using the Standard Precision (SP) mode of Glide [19]. The final pose was selected using the energetic parameter E_{model} . Final binding modes were optimized along with the protein pocket using Prime MM-GBSA [19]. Docking protocol was previously validated through the root mean square deviation (RMSD) between the theoretical poses and the co-crystallized conformations of different ligands [20,21]. As an example the RMSD for the co-crystallized coumarins in 2V60 and 2V61 [20] in the current study are 0.56 and 1.30 respectively.

4.10. Cytotoxicity

SH-SY5Y, a twice-subcloned cell line derived from the SK-N-SH neuroblastoma cell line (ATCC CRL-2266) which is used widely in

experimental neurological studies such as neurotoxicity and neuroprotection, were grown and kept in culture as described elsewhere [30].

For experiments SH-SY5Y cells ($1.10^6/\text{mL}$) were seeded in each well of 96-well culture plate. After overnight incubation, solution of compounds **9–11** in DMSO (1%) was added to the cells.

Cells treated with DMSO 1% were used as negative control. After further incubation for 24 h, 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) assay was performed to measure cell viability [26].

Briefly, 10% of MTT solution (5 mg/mL in PBS) was added to each well. After incubation for 2 h at 37 °C, MTT solution was removed and 100 μL of DMSO was added to dissolve the crystals formed. Then, absorbance at 540 nm was read using a microplate reader. The percentage cell viability was calculated as $[\text{Absorbance (treatment)}/\text{Absorbance (negative control)}] \times 100\%$.

Acknowledgments

Financial support from Universidade de Vigo, the Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria (CN2012/184, and EM2014/016 and Centro singular de investigación de Galicia acreditación 2016–2019, ED431G/05) and the European Regional Development Fund (ERDF), is gratefully acknowledged. M.C.C.-L. thanks the Xunta de Galicia for her PhD fellowship.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.045>.

References

- [1] J.C. Shih, K. Chen, M.J. Ridd, *Annu. Rev. Neurosci.* 22 (1999) 197–217.
- [2] D.E. Edmondson, C. Binda, J. Wang, A.K. Upadhyay, A. Mattevi, *Biochemistry* 48 (2009) 4220–4230.
- [3] H.H. Fernández, J.J. Chen, *Pharmacotherapy* 27 (2007) 1475–1855.
- [4] M.B.H. Youdin, Y.S. Bakhle, *Brit. J. Pharmacol.* 147 (2006) S287–S296.
- [5] J.P.M. Finberg, *Pharmacol. Ther.* 143 (2014) 133–152.
- [6] E.D. Deeks, *Drugs* 75 (2015) 705–711.
- [7] (a) P. Rieder, W. Danielczyk, E. Grünblatt, *Neurotoxicology* 25 (2004) 271–277;
(b) M. Ebadi, H. Brown-Borg, J. Ren, S. Sharma, S. Shavali, et al., *Curr. Drug Targets* 7 (2006) 1513–1529;
(c) M. Naoi, W. Maruyama, K. Inaba-Hasegawa, *Expert Rev. Neurother.* 120 (2013) 671–684.
- [8] (a) S. Carradori, R. Silvestri, *J. Med. Chem.* 58 (2015) 6717–6732;
(b) S. Distinto, R. Meleddu, M. Yáñez, R. Cirilli, G. Bianco, M.L. Sanna, A. Arridu, P. Cossu, F. Cottiglia, C. Faggi, F. Ortuso, S. Alcaro, E. Maccioni, *Eur. J. Med. Chem.* 108 (2016) 542–552;
(c) A. Hammuda, R. Shalaby, S. Rovida, D.E. Edmondson, C. Binda, A. Khalil, *Eur. J. Med. Chem.* 114 (2016) 162–169.
- [9] (a) R. Fioravanti, N. Desideri, M. Biava, L. Proietti Monaco, L. Grammatica, M. Yáñez, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23 (2013) 5128–5130;
(b) L. Meiring, J.P. Petzer, A. Petzer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23 (2013) 5498–5502;
(c) Z.V. Chirkova, M.V. Kabanova, S.I. Filimonov, I.G. Abramov, A. Petzer, J.P. Petzer, S.I. Firgang, K.Y. Suponitsky, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25 (2015) 1206–1211;
(d) N.T. Tzvetkov, S. Hinz, M. Gastreich, C.E. Müller, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 6679–6703;
(e) M.-H. Nam, M. Park, H. Park, Y. Kim, S. Yoon, V.S. Sawant, J.W. Choi, J.-H. Park, K.D. Park, S.-J. Min, C.J. Lee, H. Choo, *ACS Chem. Neurosci.* (2017), <http://dx.doi.org/10.1021/acschemneuro.7b00050>.
- [10] (a) E. Maccioni, S. Alcaro, R. Cirilli, S. Vigo, M.C. Cardia, M.L. Sanna, R. Meleddu, M. Yáñez, G. Costa, L. Casu, P. Mathyus, S. Distinto, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 6394–6398;
(b) J. Reis, F. Cagide, D. Chavarria, T. Silva, C. Fernandes, A. Gaspar, E. Uriarte, R. Remiao, S. Alcaro, F. Ortuso, F. Borges, *J. Med. Chem.* 59 (2016) 5879–5893;
(c) M.D. Mertens, S. Hinz, C.E. Müller, M. Gütschow, *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 1916–1928;
(d) L. Pisani, R. Farina, O. Nicolotti, D. Gadeta, R. Soto-Otero, M. Catto, M. di Braccio, E. Méndez-Álvarez, A. Carotti, *Eur. J. Med. Chem.* 89 (2015) 98–105;
(e) J. Joubert, G.B. Foka, B.P. Repsold, D.W. Oliver, E. Kapp, S.F. Malan, *Eur. J. Med. Chem.* 125 (2017) 853–864.

- [11] (a) F. Chimentì, D. Secci, A. Bolasco, P. Chimentì, B. Bizarri, A. Granese, S. Carradori, M. Yañez, F. Orallo, F. Ortuso, S. Alcaro, J. Med. Chem. 52 (2009) 1935–1942;
(b) D. Secci, S. Carradori, A. Bolasco, P. Chimentì, M. Yañez, F. Ortuso, S. Alcaro, Eur. J. Med. Chem. 46 (2011) 4846–4852;
(c) M.J. Matos, D. Viña, C. Picciau, F. Orallo, L. Santana, E. Uriarte, Bioorg. Med. Chem. Lett. 19 (2009) 5053–5055;
(d) M.J. Matos, D. Viña, P. Janeiro, F. Borges, L. Santana, E. Uriarte, Bioorg. Med. Chem. Lett. 20 (2010) 5157–5160.
- [12] (a) M.J. Matos, C. Terán, Y. Pérez-Castillo, E. Uriarte, L. Santana, D. Viña, J. Med. Chem. 54 (2011) 7127–7137;
(b) M.J. Matos, S. Vilar, V. García-Morales, N.P. Tachonetti, E. Uriarte, L. Santana, D. Viña, ChemMedChem 9 (2014) 1488–1500;
(c) M.J. Matos, F. Rodríguez-Enríquez, S. Vilar, L. Santana, E. Uriarte, G. Hripcsak, M. Estrada, M.I. Rodríguez-Franco, D. Viña, Bioorg. Med. Chem. Lett. 25 (2015) 642–648.
- [13] (a) G. Delogu, C. Picciau, G. Ferino, E. Quezada, G. Podda, E. Uriarte, D. Viña, Eur. J. Med. Chem. 46 (2011) 1147–1152;
(b) J.-S. Lan, L.-F. Pan, S.-S. Xie, X.-B. Wang, L.-Y. Kong, Med. Chem. Commun. 6 (2015) 592–600.
- [14] B.E. Evans, K.E. Rittle, M.G. Bock, R.M. Dipardo, R.M. Freidinger, W.L. Whitter, G.F. Lundell, D.F. Veber, P.S. Anderson, J. Med. Chem. 31 (1998) 2235–2246.
- [15] (a) M.E. Riveiro, N. De Kimpe, A. Moglioni, R. Vazquez, F. Monczor, C. Shayo, C. Davio, Curr. Med. Chem. 17 (2010) 1325–1338;
(b) C.G. Wermuth, Med. Chem. Commun. 2 (2011) 935–941.
- [16] C.F. Ingham, R.A. Massy-Westropp, G.D. Reynolds, W.D. Thorpe, Aus. J. Chem. (1975) 2499–2510.
- [17] A. Lees, Drugs Aging 22 (2005) 731–740.
- [18] R.A. Copeland, Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery, Wiley-Interscience, Hoboken, 2005.
- [19] Schrödinger Suite 2014-3, Schrödinger, LLC, New York, USA, 2014. Available at: <http://www.schrodinger.com/> (Accessed August 2015).
- [20] C. Binda, J. Wang, L. Pisani, C. Caccia, A. Carotti, P. Salvati, D.E. Edmondson, A. Mattevi, J. Med. Chem. 50 (2007) 5848–5852.
- [21] (a) G. Delogu, S. Serra, E. Quezada, E. Uriarte, S. Vilar, N.P. Tatonetti, D. Viña, ChemMedChem 9 (2014) 1672–1676;
(b) M.J. Matos, P. Janeiro, R.M. González Franco, S. Vilar, N.P. Tatonetti, L. Santana, E. Uriarte, F. Borges, J.A. Fontenla, D. Viña, Future Med. Chem. 6 (2014) 371–383.
- [22] RCSB Protein Data Bank – RCSB PDB. <http://www.rcsb.org/>.
- [23] F. Liu, Y. Wang, C. Lv, L. Wang, J. Ou, M. Wang, S. Liu, Molecules 17 (2012) 2000–2014.
- [24] (a) D.E. Edmondson, L. DeColibus, C. Binda, A. Li, M. Mattevi, J. Neural. Transm. 114 (2007) 703–705;
(b) M. Mladenovic, A. Patsilinos, A. Piroli, M. Sabatino, R. Ragno, J. Chem. Inf. Model 57 (2017) 787–814.
- [25] M.J. Matos, S. Vilar, R.M. González-Franco, E. Uriarte, L. Santana, C. Friedman, N.P. Tatonetti, D. Viña, J.A. Fontenla, Eur. J. Med. Chem. 63 (2013) 151–161.
- [26] Y. Liu, D.A. Peterson, H. Kimura, D. Schubert, J. Neurochem. 69 (1997) 581–593.
- [27] M. Cheminformatics, Bratislava, Slovak Republic, <http://www.molispiration.com/services/properties.html> (Accessed May 2017).
- [28] C.A. Lipinsky, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeny, Adv. Drug Deliv. Rev. 23 (1997) 3–25.
- [29] <http://www.cbligand.org/BBB/index.php>.
- [30] R. Constantinescu, A.T. Constantinescu, H. Reichmann, B. Janetzky, J. Neural. Transm. 572 (2007) 17–28.



3-Amidocoumarins as Potential Multifunctional Agents against Neurodegenerative Diseases

Maria João Matos,^{*,[a]} Fernanda Rodríguez-Enríquez,^[b] Fernanda Borges,^{*,[a]} Lourdes Santana,^[c] Eugenio Uriarte,^[c] Martín Estrada,^[d] María Isabel Rodríguez-Franco,^[d] Reyes Laguna,^[b] and Dolores Viña^{*,[b]}

Monoamine oxidase (MAO) generates reactive oxygen species (ROS), which cause neuronal cell death, causing neurodegeneration. Agents that are able to concurrently inhibit MAO and scavenge free radicals represent promising multifunctional neuroprotective agents that could be used to delay or slow the progression of neurodegenerative diseases. In this work, variously substituted 3-amidocoumarins are described that exert neuroprotection in vitro against hydrogen peroxide in rat cortical neurons, as well as antioxidant activity in a 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH·) radical scavenging assay. Selective and reversible inhibitors of the MAO-B isoform were identified. Interestingly, in the case of the 3-benzamidocoumarins, substi-

tution at position 4 with a hydroxy group abolishes MAO-B activity, but the compounds remain active in the neuroprotection model. Further evaluation of 3-heteroarylamine derivatives indicates that it is the nature of the heterocycle that determines the neuroprotective effects. Evaluation in a parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) highlighted the need to further improve the blood–brain barrier permeability of this compound class. However, the compounds described herein adhere to Lipinski's rule of five, suggesting that this novel scaffold has desirable properties for the development of potential drug candidates.

Introduction

Neurodegenerative diseases (ND) are characterized by a decrease in the number of cells of certain neuronal populations, and are clinically reflected by the appearance of specific symptoms, such as modification in the control and coordination of movement in Parkinson's disease (PD) or alterations in the language and memory processes in Alzheimer's disease (AD).^[1] Their chronic course produces a gradual but steady deterioration, the final step of which is death.^[2] Because of this, as the disease progresses, it erodes the quality of life for patients.^[3] Therefore, the development of effective neuroprotective therapies that slow down or stop the disease's progression at the

earliest stages is one of the main goals of researchers in this area.^[4]

At the cellular level, PD is related to excess production of reactive oxygen species (ROS), to alterations in catecholamine metabolism, to modifications in mitochondrial electron transporter chain (METC) function, and to enhancement of iron deposition in the substantia nigra pars compacta (SNpc).^[5] The failure of normal cellular processes that occur in relation to aging are also believed to contribute to the increased vulnerability of dopaminergic neurons.^[6] Although the precise mechanism corresponding to ROS generation related to PD is still unknown, the major sources of oxidative stress generated by the dopaminergic neurons are dopamine metabolism, mitochondrial dysfunction, and neuroinflammation.^[7]

Metabolism of dopamine by monoamine oxidase (MAO) yields hydrogen peroxide, an oxygen radical that leads to cytotoxicity through the peroxidation of lipid membranes. Selegiline and rasagiline, two selective MAO-B inhibitors, are currently used to retard the symptoms in PD because they increase dopamine levels and may exert neuroprotective effects. Inhibition of MAO-B decreases oxygen radical generation, although new neuroprotective functions independent of MAO-inhibitory activity have been reported for these drugs.^[8] The occurrence of oxidative stress in PD patients is supported by postmortem studies and by preclinical studies showing the ability of oxidizing toxins to induce cell death in the SN.^[9] Accordingly, antioxidants such as tocopherol and ascorbate that scavenge free radicals and other reactive species may have beneficial therapeutic effects in PD by preventing the onset of apoptosis and

[a] Dr. M. J. Matos, Prof. F. Borges
CIQUP/Departamento de Química e Bioquímica
Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, 4169-007 Porto (Portugal)
E-mail: mariacmatos@gmail.com
fborges@fc.up.pt

[b] F. Rodríguez-Enríquez, Prof. R. Laguna, Prof. D. Viña
Departamento de Farmacología, CIMUS
Universidad de Santiago de Compostela
15782 Santiago de Compostela (Spain)
E-mail: mdolores.vina@usc.es

[c] Prof. L. Santana, Prof. E. Uriarte
Departamento de Química Orgánica, Facultad de Farmacia
Universidad de Santiago de Compostela,
15782 Santiago de Compostela (Spain)

[d] Dr. M. Estrada, Prof. M. I. Rodríguez-Franco
Instituto de Química Médica
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQM-CSIC)
C/Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid (Spain)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201500408>.

neuronal degeneration of the dopaminergic nigrostriatal pathway.^[10] Nonetheless, all approved PD pharmacotherapies have limited efficacy, do not prevent the progression of the disease, and are associated with adverse motor and non-motor side effects.^[11] Accordingly, there is an urgent need to develop novel therapies that are superior to current therapies.

Throughout the history of medicine, nature has played a key role as source of inspiration in the development of drugs with important biological activities. Coumarins (2*H*-1-benzopyran-2-one), common metabolites in plants that have also been detected in microorganisms and animal sources,^[12] have been the focus of much interest owing to several pharmacological activities they display.^[13] The specific pharmacological and biochemical properties and therapeutic applications of simple coumarins depend on the substituents present on the core scaffold.^[13] Among the thousands of various coumarins present, some natural and synthetic versions have been evaluated against a wide range of pharmacological targets of particular interest in medicinal chemistry.^[14] Coumarins have been found to act as antioxidants and anti-inflammatory agents,^[15] neuroprotective agents,^[16,17] antidepressants,^[18] anticonvulsants,^[19] antibacterials,^[20] antivirals,^[21] anticancer agents,^[22,23] anticoagulants,^[24] anti-hypertensives,^[25] and enzyme inhibitors,^[26–33] among other activities. More recently it was found that simple coumarins, usually substituted at positions 3, 4, 6, 7, or 8, have MAO inhibitory activities, making them an interesting option in the search for new drugs for the treatment of ND.^[27–33] In recent years, simple coumarins substituted at positions 3 or 4 have been described to exhibit activity as inhibitors of cholinesterases (ChE), both acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE). The planarity and aromaticity of these derivatives proved to be essential for activity. Substitution at positions 3 and 4 of the coumarin ring also afforded derivatives found to be β -secretase 1 (BACE-1) inhibitors.^[26,29] All these properties encouraged us to study variously substituted coumarins as lead compounds with potential capacities as therapeutics to treat ND. In recent years our research group has been studying 3-substituted coumarins with activity at different targets involved in ND. The introduction of an amide group as a linker between the coumarin skeleton and a phenyl group at position 3 yielded coumarins with dual activity as MAO and ChE inhibitors.^[29] The introduction of hydroxy groups enhanced the antioxidant properties of these compounds.^[34]

Taking into account the background of our research group (Figure 1)^[28–33] and the knowledge that MAO activity generates ROS that cause neuronal cell death, the present work provides an overview on the potential of variously substituted 3-amidocoumarins as multifunctional agents. They are able to selectively inhibit MAO-B, scavenge free radicals and protect neuronal cells from H₂O₂-mediated damage, representing a promising multifunctional scaffold for the development of neuroprotective agents that could delay or slow the progression of ND. Herein we describe our studies of the activities of 3-amidocoumarins with amides introduced at position 3 and a hydroxy group at position 4.

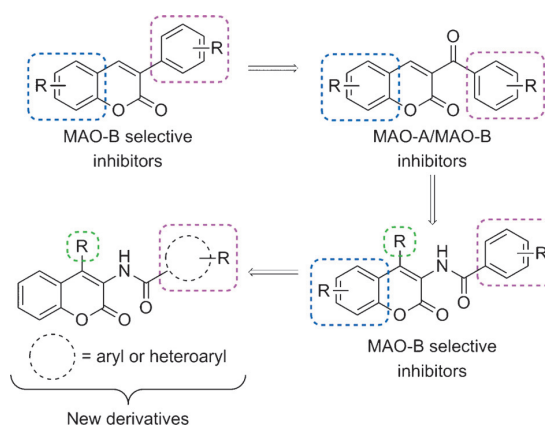


Figure 1. Rationale behind the design of the compounds studied in this work.

Results and Discussion

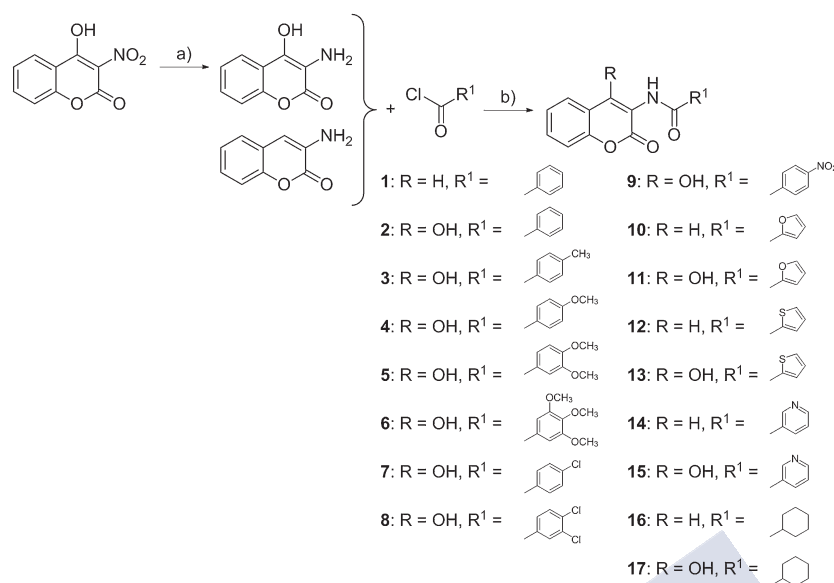
Chemistry

The studied derivatives were efficiently synthesized according to the protocol outlined in Scheme 1. Coumarins **1–17** were prepared by starting from commercially available 3-aminocoumarin, or from 3-amino-4-hydroxycoumarin, which was prepared by reduction of the commercially available 3-nitro-4-hydroxycoumarin in ethanol, using palladium on charcoal as a catalyst, under an atmosphere of H₂ for 5 h, with a yield of 90%.^[35,36] Acylation of the 3-aminocoumarins with the conveniently substituted acid chloride, using pyridine in dichloromethane, from 0 °C to room temperature, afforded the variously 3-substituted coumarins **1–17** in yields between 80 and 90%.^[32,37–42] The reaction conditions and characterization of the new compounds are detailed in the Experimental Section below.

Pharmacology

MAO *in vitro* inhibition

Biological evaluation of the test drugs on human MAO (hMAO) activity was investigated by measuring their effects on the production of H₂O₂ from *p*-tyramine (a common substrate for hMAO-A and hMAO-B), using the Amplex Red MAO assay kit and microsomal MAO isoforms prepared from insect cells (BTI-TN-5B1-4) infected with recombinant baculovirus containing cDNA inserts for hMAO-A or hMAO-B.^[43] The production of H₂O₂ catalyzed by the two MAO isoforms can be detected using 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex Red reagent), a non-fluorescent and highly sensitive probe that reacts with H₂O₂ in the presence of horseradish peroxidase to produce a fluorescent product: resorufin. New compounds and reference inhibitors were unable to react directly with the Amplex Red reagent, which indicates that these drugs do not interfere with the measurements. On the other hand, under the experimental conditions, hMAO-A displayed a Michaelis–



Scheme 1. Reagents and conditions: a) H₂, EtOH, Pd/C, RT, 5 h; b) pyridine, CH₂Cl₂, 0 °C → RT, overnight.

Menten constant (K_M) equal to $457.17 \pm 38.62 \mu\text{M}$ and a maximum reaction velocity (V_{max}) in the control group of 185.67 ± 12.06 (nmol *p*-tyramine min⁻¹) (mg protein)⁻¹, whereas hMAO-B showed a K_M value of $220.33 \pm 32.80 \mu\text{M}$ and a V_{max} of 24.32 ± 1.97 (nmol *p*-tyramine min⁻¹) (mg protein)⁻¹ ($n=5$). Most compounds tested were found to inhibit this enzymatic control activity in a concentration-dependent manner. The experimental IC₅₀ results are listed in Table 1.

As shown in Table 1, many of the studied compounds displayed selective inhibitory activity against hMAO-B in the micromolar range, with compound **1** being the most active derivative of the series (IC₅₀ = 0.76 μM). Regarding the 3-benzamido-coumarins and comparing with previously published results,^[29] it was observed that the introduction of a hydroxy group at position 4 of the coumarin scaffold generally resulted in a loss of activity against hMAO-B, with derivatives **2–5**, **7**, and **9** lacking this activity. In fact, from this series, only compound **6** presented hMAO-B inhibitory activity (IC₅₀ = 36.91 μM). An identical response was observed with the 3-substituent as a heteroaryl amide group, with a hydroxy group at position 4. In general, a decrease in (in the case of the thiophenyl derivative) or loss of hMAO activity (in the case of the furanyl and pyridyl derivatives) was observed. Moreover, the nature of the heterocycle determined the activity, and compounds with a thiophene ring in their structure (**12** and **13**) proved to be active against hMAO-B (IC₅₀: 2.27 and 15.50 μM , respectively), whereas those with a furan ring (**10** and **11**) lack such activity. Compounds bearing a pyridine ring (**14** and **15**) follow the general trend observed for the hydroxylated compounds. Compound **14**, without a hydroxy group at position 4, displayed activity against hMAO-B (IC₅₀ = 21.11 μM), whereas compound **15**, with a hydroxy group at position 4, did not. For derivatives with an amide function at position 3 linked to a cyclohexane group

(compounds **16** and **17**), the introduction of a hydroxy group at position 4 was found to improve activity against hMAO-B (IC₅₀: 49.96 and 22.47 μM , respectively). This proved to be the only case in which the introduction of a hydroxy group at position 4 led to a slight improvement in activity.

Reversibility

Reversibility experiments were performed to evaluate the type of inhibition effected by derivatives **1**, **12**, **14**, and **17** (Table 2). These compounds were selected based on their structure and activity against hMAO-B. An effective dilution method was used, and selegiline (irreversible inhibitor) and isatin (reversible inhibitor)

Table 1. In vitro hMAO-A and hMAO-B inhibitory activity of the synthesized derivatives **1–17** and reference compounds.

Compd	IC ₅₀ [μM] ^[a]		SI ^[b]
	hMAO-A	hMAO-B	
1	inact. ^[e]	0.76 ± 0.05	> 131.6 ^[d]
6	inact. ^[e]	36.91 ± 2.48	> 2.7 ^[d]
8	inact. ^[e]	19.00 ± 1.27	> 5.3 ^[d]
10	inact. ^[e]	~ 100 ^[f]	–
11	inact. ^[e]	~ 100 ^[f]	–
12	inact. ^[e]	2.27 ± 0.15	> 44.1 ^[d]
13	inact. ^[e]	15.50 ± 1.04	> 6.5 ^[d]
14	inact. ^[e]	21.11 ± 1.42	> 4.7 ^[d]
16	inact. ^[e]	49.96 ± 3.35	> 2.0 ^[d]
17	inact. ^[e]	22.47 ± 1.51	> 4.5 ^[d]
selegiline	67.25 ± 1.02 ^[c]	0.019 ± 0.001 ^[3]	3539
rasagiline	16.44 ± 0.85	0.069 ± 0.004	238
isatin	inact. ^[e]	33.07 ± 1.47	> 3.0

[a] Values are the mean ± SEM of $n=5$ experiments; compounds **2–5**, **7**, **9**, and **15** proved to be inactive toward both MAO-A and MAO-B at the highest concentration tested (100 μM). [b] Selectivity index: MAO-B selectivity ratios [IC₅₀ (MAO-A)]/[IC₅₀ (MAO-B)] for inhibitory effects of both new compounds and reference inhibitors. [c] $p < 0.01$ regarding the corresponding IC₅₀ value obtained against MAO-B, as determined by ANOVA/Dunnett's. [d] Values obtained under the assumption that the corresponding IC₅₀ value against MAO-A is > 100 μM . [e] Inactive at 100 μM (highest concentration tested). [f] 100 μM inhibits enzymatic activity by ~50–55%; at higher concentrations the compounds precipitate.

tor) were taken as standards.^[44,45] hMAO-B inhibition was observed to be reversible in the presence of all four of these compounds with their degree of reversibility being lower than that described for isatin (reversible reference compound).

Table 2. Reversibility results of hMAO-B inhibition studied for derivatives 1, 12, 14 and 17, and reference inhibitors.

Compd	Slope (AUF/t) [%] ^[a]
1	41.51 ± 2.79
12	63.04 ± 4.23
14	38.43 ± 2.58
17	67.76 ± 4.55
selegiline	3.21 ± 0.21
isatin	88.63 ± 5.94

[a] Values represent the mean ± SEM of $n=3$ experiments relative to control; data show recovery of hMAO-B activity after dilution.

Neuronal survival

Compounds 1–17 were studied in vitro to evaluate their neuroprotective potential along with their MAO activity and to assess their effect on oxidative stress. First, to discard any possible cytotoxic effects of compounds 1–17 against rat cortical neurons, cell viability was assessed after 24 h treatment with the new compounds, each at 100 μM . The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, which detects cellular dehydrogenase activity, was used. Cells that are metabolically impaired are less able to reduce MTT than healthy cells. In comparison with control (1% DMSO), only compounds 10 and 11 were found to induce a significant decrease in cell viability at 100 μM post-treatment, whereas the rest of the test compounds were devoid of any cytotoxic activity (Figure 2A).

The neuroprotective effects of compounds 1–17 were then assessed in cultured rat cortical neurons exposed to H_2O_2 . Neurons incubated with or without compounds 1–17 (100 μM) were exposed to H_2O_2 (30 μM) at the same time point and incubated for 24 h. The toxin-treatment group in the cell viability assays showed a significant difference in the production of toxicity relative to those treated with DMSO alone. The results obtained by studying the possible neuroprotective effects of our new compounds against the effects of H_2O_2 in the cells are shown in Figure 2B.

From the 3-benzamidocoumarins 1–9, the most promising results against the effects of H_2O_2 (Figure 2B) corresponded, in general, to derivatives with a hydroxy group at position 4 of the coumarin scaffold and a single substituent at the *para* position of the benzamide at position 3 (compounds 3, 7, and 9). In the case of 3-heteroarylamido- and 3-cyclohexanecarboxamidocoumarins 10–17, we observed that derivatives with a nicotinamide group at position 3 (compounds 14 and 15) exerted a statistically significant level of neuroprotection, whereas compounds were found to be inactive against H_2O_2 if the pyridine ring was substituted for cyclohexane, thiophene, or furan. Under these conditions, rasagiline (5 μM) did not display significant neuroprotection. In view of these results it is possible that other mechanisms beyond MAO inhibition may be involved in the neuroprotective activity of these derivatives.

Neuroprotection exerted by these compounds is concentration dependent. Therefore, a decrease in neuroprotection is observed when cultured rat cortical neurons were exposed to

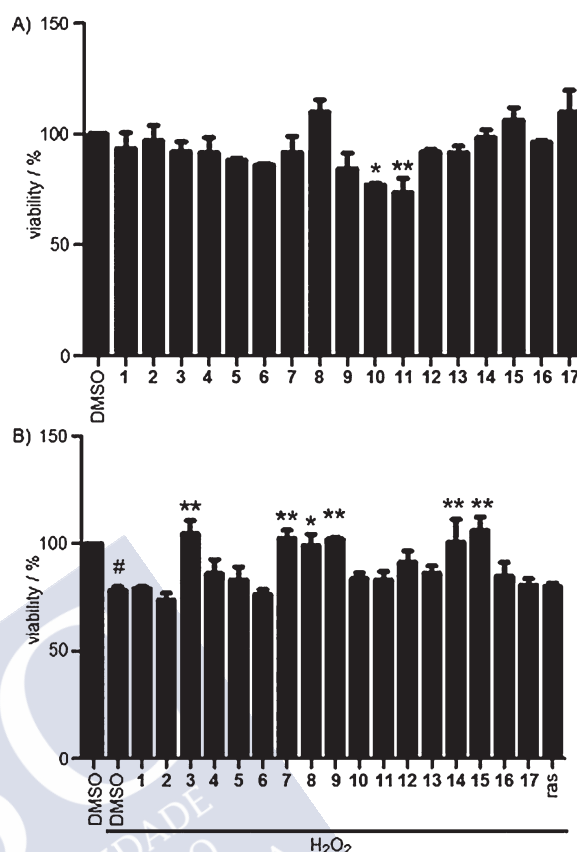


Figure 2. A) Cytotoxicity of compounds 1–17 (100 μM) against cortical neurons, and B) neuroprotective effects of compounds 1–17 (100 μM) and rasagiline (ras; 5 μM) on cortical neurons treated with H_2O_2 and percentage of living cells in cultures exposed to DMSO/ H_2O_2 relative to cells exposed to DMSO alone. Results are expressed as the mean ± SEM of at least five independent experiments; * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ versus the corresponding viability obtained in the control group treated with DMSO (panel A) or H_2O_2 in addition to DMSO (panel B); # $p < 0.001$ versus the group treated only with DMSO.

H_2O_2 but treated with compounds 1–17 at 10 μM . No significant differences were found for neurons treated with any compounds and exposed to H_2O_2 (Table 3).

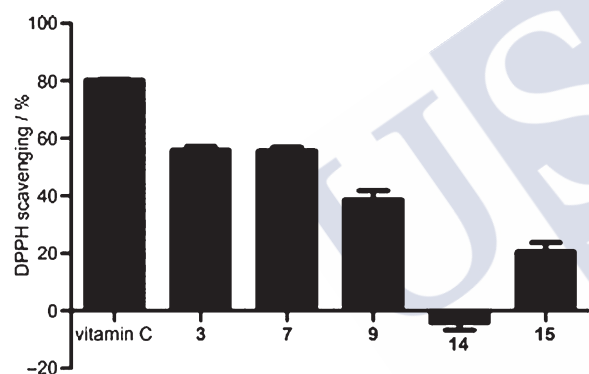
DPPH• scavenging

Under normal conditions, free radicals are rapidly neutralized in the mitochondria; over time, however, this neutralization becomes less effective, and dysfunction and even cell death occurs. We studied the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH•) scavenging activity of those compounds showing the best neuroprotective effects in cells treated with H_2O_2 (compounds 3, 7, 9, 14, and 15). As can be seen in Figure 3, most of the studied compounds were able to scavenge free radicals, with compounds 3 and 7 (100 μM) being the most active, showing scavenging activity slightly higher than 50%. These are also two of the best compounds in the series of 3-benzamidocoumarins as neuroprotective agents against H_2O_2 . In

Table 3. Cell viability after treatment with compounds 1–17 at 10 and 100 μM .

Compd	Viability [%]	
	10 μM	100 μM
DMSO + H_2O_2	72.2 \pm 1.7	78.3 \pm 1.7
1	73.3 \pm 3.1 ^[c]	79.1 \pm 1.0 ^[c]
2	68.0 \pm 2.1 ^[c]	73.6 \pm 3.3 ^[c]
3	63.8 \pm 2.6 ^[c]	104.4 \pm 6.3 ^[b]
4	69.7 \pm 3.8 ^[c]	85.9 \pm 6.7 ^[c]
5	71.7 \pm 4.3 ^[c]	83.2 \pm 5.9 ^[c]
6	78.5 \pm 6.0 ^[c]	76.3 \pm 2.3 ^[c]
7	79.4 \pm 6.5 ^[c]	102.4 \pm 3.8 ^[b]
8	71.4 \pm 7.3 ^[c]	99.1 \pm 5.2 ^[a]
9	72.2 \pm 4.0 ^[c]	101.9 \pm 0.8 ^[b]
10	72.4 \pm 6.4 ^[c]	83.6 \pm 2.8 ^[c]
11	70.6 \pm 7.3 ^[c]	83.1 \pm 3.9 ^[c]
12	68.2 \pm 3.9 ^[c]	91.3 \pm 5.3 ^[c]
13	71.3 \pm 4.7 ^[c]	86.3 \pm 3.3 ^[c]
14	67.9 \pm 6.4 ^[c]	100.7 \pm 10.6 ^[b]
15	73.6 \pm 6.4 ^[c]	106.1 \pm 6.3 ^[b]
16	72.9 \pm 0.7 ^[c]	84.9 \pm 6.3 ^[c]
17	74.2 \pm 3.6 ^[c]	80.7 \pm 3.0 ^[c]

[a] $p < 0.05$, [b] $p < 0.001$ versus the corresponding viability obtained in the control group treated with H_2O_2 + DMSO. [c] No significant differences observed with the control group (DMSO + H_2O_2).

**Figure 3.** DPPH-scavenging activity of coumarin derivatives 3, 7, 9, 14, 15, and vitamin C (positive control).

contrast, for the series of 3-nicotinamidocoumarins, compounds 14 and 15, only if a hydroxy group is present at position 4 (compound 15) is free radical scavenging activity observed (~20%). Therefore, the presence of a hydroxy group, in this specific case at position 4, seems to be crucial for neutralization of free radicals by these derivatives.

In vitro blood–brain barrier permeation

A fundamental requirement for any compound to act on neurodegenerative processes is access to brain tissue, that is, to be able to cross the blood–brain barrier (BBB). To examine the capacity of our compounds to pass this barrier, we selected compounds 3, 12, 14, and 15, some of the most active MAO inhibitors and/or neuroprotective agents, for use in a parallel artificial membrane permeation assay (PAMPA).^[46] This is a rela-

tively easy and straightforward method to predict the passive central nervous system (CNS) permeation, which had been previously optimized for application to investigated compounds with limited aqueous solubility.^[47–49] Experimental PAMPA results are listed in Table 4.

Table 4. In vitro evaluation of CNS penetration (experimental permeability, P_e) using PAMPA methodology.

Compd	P_e [$10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$] ^[a]	Prediction
3	7.4 \pm 0.01	CNS–
12	44.2 \pm 2.1	CNS+
14	20.2 \pm 0.4	CNS+
15	9.3 \pm 0.1	CNS+ / –
verapamil	14.8 \pm 0.1	CNS+

[a] Results are the mean of the experimental prediction \pm SD of at least three independent experiments.

The capacity of the compounds to pass through a lipid extract of porcine brain were determined using a 70:30 mixture of phosphate-buffered saline solution and ethanol (PBS/EtOH). In each experiment 10 commercial drugs were also evaluated for assay validation. A graphical representation of experimental permeability versus reported values of such well-known drugs gave a linear correlation: $P_e(\text{expt.}) = 0.72 P_e(\text{lit.}) + 6.70$ ($R^2 = 0.80$). From this equation and taking into account the described limits for BBB permeation, we established that compounds with permeability values $> 9.6 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ could penetrate into the CNS by passive diffusion (CNS+), whereas products with $P_e < 8.1 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ could not enter (CNS–). Between these values, the CNS permeation was considered to be uncertain (CNS+ / –). Therefore, from the selected compounds, compounds 12 and 14 (P_e : 44.2×10^{-6} and $20.2 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$, respectively) would be able to cross the BBB and reach their therapeutic targets. In addition, both compounds showed higher P_e values than verapamil ($P_e = 14.8 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$), which is generally used as a standard of high permeability. In the case of compound 15, passage through the BBB is unlikely ($P_e = 9.3 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$).

Theoretical evaluation of ADME-related physicochemical/structural parameters

To better understand the overall properties and the drug-like characteristics of compounds 1–17, the calculated lipophilicity (expressed as the octanol/water partition coefficient, or $\text{clog } P$) and theoretical predictions of other ADME properties (molecular weight, topological polar surface area (TPSA), number of hydrogen bond donors and acceptors, and molecular volume) were carried out with Molinspiration software, and are presented in the Supporting Information.^[50,51] It is significant that all the described derivatives possess $\text{clog } P$ values compatible with those required to cross membranes. Although the TPSA (described to be a predictive indicator of membrane penetration) of selegiline differs greatly from the TPSA values determined for the studied compounds, all other predicted ADME

values were found to fall in the desirable range. In addition, we observed no violations of Lipinski's rules (re. molecular weight, log *P*, number of hydrogen bond donors and acceptors). The studied compounds, as MAO inhibitors and neuroprotective agents, must pass various membranes to reach the CNS. The obtained information supports the potential of these derivatives as viable drug candidates. The theoretical information obtained is partially in accordance with results of the experimental *in vitro* BBB permeation assay. The combination of both experimental results and calculated values can aid in improving our understanding of the drug likeness of this compound series.

Conclusions

In this study, a general and efficient synthesis of a new series of 3-amidocoumarins was developed, using an amidation reaction as a key step. Determination of hMAO isoform activity was carried out, and many of the compounds exhibited selectivity for the hMAO-B isoform with activity in the nanomolar (compound 1) or micromolar ranges (compounds 6, 8, 12–14, 16, and 17). Neuroprotective effects against H₂O₂ were also studied. For the series of 3-benzamidocoumarins, the most promising results in cells treated with H₂O₂ generally corresponded to derivatives with a substituent at the *para* position of the benzamide ring, in addition to a hydroxy group at position 4 of the coumarin scaffold (compounds 3, 7, and 9). For the series of 3-heteroarylamidocoumarins, derivatives with a nicotinamide group at position 3 of the coumarin scaffold (compounds 14 and 15) exerted the most notable neuroprotection. Most of the selected derivatives exerting neuroprotection also showed DPPH· scavenging activity (with the exception of compound 14, with no hydroxy groups on its structure). Additionally, the prediction of BBB accessibility by PAMPA showed the potential of this compound class to cross the BBB and to thus exert activity in the CNS. From the four compounds studied in the PAMPA, those without a hydroxy group at position 4 proved to have a greater capacity to cross the BBB (compounds 12 and 14). Compound 15 was found partially able to cross biological barriers. In addition, prediction of ADME-related physicochemical/structural parameters provided a preliminary indication of the potential of this family of compounds as suitable molecules for further development. These results encourage us to further explore the potential of members of this chemical family as potential drug candidates for the treatment of Parkinson's disease.

Experimental Section

Chemistry

Starting materials and reagents were obtained from commercial suppliers and were used without further purification (Sigma-Aldrich). Melting points (mp) are uncorrected and were determined with a Reichert Kofler thermopan or in capillary tubes in a Büchi 510 apparatus. ¹H NMR (300 MHz) and ¹³C NMR (75.4 MHz) spectra were recorded with a Bruker AMX spectrometer using CDCl₃ or [D₆]DMSO as solvent. Chemical shifts (δ) are expressed in ppm

using TMS as an internal standard. Coupling constants (*J*) are expressed in Hz. Spin multiplicities are given as s (singlet), d (doublet), dd (doublet of doublets), td (triplet of doublets), and m (multiplet). Mass spectrometry was carried out with a Hewlett-Packard 5972 MSD spectrometer. Elemental analyses were performed with a PerkinElmer 240B microanalyzer and are within 0.4% of calculated values in all cases. Flash chromatography (FC) was performed on silica gel (Merck 60, 230–400 mesh); analytical TLC was performed on pre-coated silica gel plates (Merck 60 F₂₅₄). Organic solutions were dried over anhydrous Na₂SO₄. Concentration and evaporation of the solvent after reaction or extraction was carried out on a rotary evaporator (Büchi Rotavapor) operating at reduced pressure. The analytical results showed >95% purity for all compounds.

Preparation of the precursor 3-amino-4-hydroxycoumarin. The commercially available 4-hydroxy-3-nitrocoumarin (2.5 mmol) was dissolved in EtOH, and a catalytic amount of Pd/C was added to the mixture. The solution was stirred at room temperature under H₂ atmosphere for 5 h. After completion of the reaction, the mixture was filtered to remove the catalyst. The obtained crude product was then purified by FC (hexane/EtOAc, 9:1) to give the desired coumarin in 90% yield.

General procedure for the preparation of 3-amidocoumarins 1–17. The 3-aminocoumarin (commercially available) or the 3-amino-4-hydroxycoumarin (1 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (9 mL). Pyridine (1.1 mmol) was then added, and the mixture was cooled to 0 °C. Various substituted acid chloride (1.1 mmol) was added dropwise at this temperature, and the mixture was stirred overnight at room temperature. The batch was evaporated and purified by column chromatography (hexane/EtOAc, 9:1) to give the desired compounds 1–17.

N-(4-Hydroxycoumarin-3-yl)-4-methylbenzamide (3): white solid (83% yield); *R*_f = 0.26 (9:1, hexane/EtOAc); mp: 210–211 °C; ¹H NMR ([D₆]DMSO): δ = 2.49 (s, 3H, CH₃), 7.31 (s, 1H, H-4), 7.37–7.44 (m, 4H, H-6, H-8, H-3', H-5'), 7.64–7.70 (m, 1H, H-7), 7.89–7.92 (m, 3H, H-5, H-2', H-6'), 9.47 (s, 1H, NH), 12.13 ppm (s, 1H, OH); ¹³C NMR ([D₆]DMSO): δ = 21.0, 113.1, 116.2, 116.3, 123.7, 124.3, 128.1, 128.8, 130.9, 132.4, 141.7, 151.6, 159.3, 160.4, 166.4 ppm; MS *m/z* (%): 296 (6), 295 ([M⁺], 29), 119 (100), 91 (30), 65 (10); Anal. calcd for C₁₇H₁₃NO₄: C 69.15, H 4.44, N 4.74, O 21.67, found: C 69.12, H 4.42, N 4.77.

N-(4-Hydroxycoumarin-3-yl)-3',4'-dimethoxybenzamide (5): white solid (88% yield); *R*_f = 0.25 (9:1, hexane/EtOAc); mp: 247–248 °C; ¹H NMR ([D₆]DMSO): δ = 3.82 (s, 6H, (CH₃)₂), 7.07 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-5'), 7.40–7.45 (m, 2H, H-6, H-8), 7.59–7.69 (m, 3H, H-2', H-6', H-7), 7.90 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-5), 9.44 (s, 1H, NH), 12.20 ppm (s, 1H, OH); ¹³C NMR ([D₆]DMSO): δ = 56.3, 103.9, 111.5, 112.0, 116.9, 122.3, 124.3, 125.0, 126.6, 133.0, 148.8, 152.2, 152.4, 159.9, 161.1, 166.8; DEPT ¹³C NMR ([D₆]DMSO): δ = 56.3, 111.5, 112.0, 116.9, 122.3, 124.3, 125.0, 133.0 ppm; MS *m/z* (%): 342 (6), 341 ([M⁺], 15), 323 (6), 165 (100), 121 (6), 92 (7), 77 (9); Anal. calcd for C₁₈H₁₅NO₆: C 63.34, H 4.43, N 4.10, O 28.12, found: C 63.31, H 4.41, N 4.12.

N-(4-Hydroxycoumarin-3-yl)-3',4'-dichlorobenzamide (8): white solid (86% yield); *R*_f = 0.22 (9:1, hexane/EtOAc); mp: 284–285 °C; ¹H NMR ([D₆]DMSO): δ = 7.37–7.44 (m, 2H, H-6, H-8), 7.64–7.70 (m, 1H, H-5') 7.79–7.96 (m, 3H, H-6', H-5, H-7), 8.24 (s, 1H, H-2'), 9.78 (s, 1H, NH), 12.24 ppm (s, 1H, OH); ¹³C NMR ([D₆]DMSO): δ = 87.0, 116.5, 123.8, 123.9, 124.0, 124.5, 128.4, 130.1, 130.8, 131.3, 132.7, 134.5, 150.5, 151.5, 160.1, 163.2 ppm; MS *m/z* (%): 351 (54), 350 ([M⁺], 15), 349 (84), 333 (22), 331 (34), 175 (100), 174 (94), 147 (24), 145 (36), 121 (19), 111 (14), 109 (14), 85 (17), 71 (19), 69 (14), 65

(14), 57 (19); Anal. calcd for $C_{16}H_9Cl_2NO_4$: C 54.88, H 2.59, Cl 20.25, N 4.00, O 18.28, found: C 54.85, H 2.55, Cl 20.28, N 3.99.

N-(Coumarin-3-yl)furan-2-carboxamide (10): white solid (90% yield); R_f = 0.42 (9:1, hexane/EtOAc); mp: 183–184 °C; 1H NMR ($CDCl_3$): δ = 6.74 (dd, J = 3.6, 1.8 Hz, 1H, H-4'), 7.34–7.58 (m, 4H, H-5, H-6, H-8, H-5'), 7.77 (td, J = 8.0, 1.4 Hz, 1H, H-7), 8.00 (dd, J = 1.8, 0.8 Hz, 1H, H-3'), 8.58 (s, 1H, H-4), 9.26 ppm (s, 1H, NH); ^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 112.1, 113.2, 115.7, 116.8, 122.9, 124.3, 126.2, 126.8, 127.7, 145.8, 146.5, 149.5, 155.3, 159.8 ppm; MS m/z (%): 256 (16), 255 ($[M^+]$, 79), 227 (7), 132 (6), 95 (100), 77 (10); Anal. calcd for $C_{14}H_9NO_4$: C 65.88, H 3.55, N 5.49, O 25.07, found: C 65.87, H 3.56, N 5.52.

N-(4-Hydroxycoumarin-3-yl)cyclohexanecarboxamide (17): white solid (91% yield); R_f = 0.27 (9:1, hexane/EtOAc); mp: 199–200 °C; 1H NMR ($CDCl_3$): δ = 1.17–1.69 (m, 6H, $(CH_2)_3$), 1.75–2.06 (m, 4H, $(CH_2)_2$), 2.30–2.55 (m, 1H, CH), 7.30–7.40 (m, 2H, H-6, H-8), 7.56 (td, J = 7.8, 1.7 Hz, 1H, H-7), 8.01 (dd, J = 7.9, 1.7 Hz, 1H, H-5), 8.28 (s, 1H, NH), 13.87 ppm (s, 1H, OH); ^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 25.4, 25.7, 29.7, 45.5, 104.7, 116.2, 117.2, 124.4, 124.7, 131.6, 150.5, 152.8, 161.2, 177.6 ppm; MS m/z (%): 288 (5), 287 ($[M^+]$, 25), 177 (54), 121 (18), 111 (22), 83 (100), 55 (43); Anal. calcd for $C_{16}H_{17}NO_4$: C 66.89, H 5.96, N 4.88, O 22.27, found: C 66.91, H 5.99, N 4.85.

Pharmacological assays

Activity against MAO isoforms: The tested compounds were dissolved in DMSO (Sigma–Aldrich, Alcobendas, Madrid, Spain) to prepare 10 mM stock solutions, which were kept in storage at –20 °C. Percentage of DMSO used in the experiments was never > 1%. Selegiline and rasagiline, used as reference inhibitors, were acquired from Sigma–Aldrich (Alcobendas). Human recombinant MAO isoforms, used in the experiments, were also purchased from Sigma–Aldrich (Alcobendas). Resorufin sodium salt, *p*-tyramine hydrochloride, sodium phosphate buffer, horseradish peroxidase and Amplex Red reagent were supplied in the Amplex Red MAO assay kit (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). Briefly, 0.1 mL of sodium phosphate buffer (0.05 M, pH 7.4) containing various concentrations of the test drugs (new compounds or reference inhibitors) and adequate amounts of recombinant hMAO-A or hMAO-B required and adjusted to obtain the same reaction velocity under our experimental conditions, i.e., to oxidize (in the control group) the same concentration of substrate: 165 pmol of *p*-tyramine per min (hMAO-A: 1.1 μ g protein; specific activity: 150 nmol of *p*-tyramine oxidized to *p*-hydroxyphenylacetaldehyde per min per mg protein; hMAO-B: 7.5 μ g protein; specific activity: 22 nmol of *p*-tyramine transformed per min per mg protein) were incubated for 15 min at 37 °C in a flat black-bottom 96-well microtest plate, placed in the dark fluorimeter chamber. After this incubation period, the reaction was started by adding (final concentrations) 200 μ M Amplex Red reagent, 1 U mL^{–1} horseradish peroxidase, and 1 mM *p*-tyramine. The production of H_2O_2 and, consequently, of resorufin was quantified at 37 °C in a multi-detection microplate fluorescence reader (FLX800, Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) based on the fluorescence generated (λ_{ex} 545 nm, λ_{em} 590 nm) over a 15 min period, in which the fluorescence increased linearly.^[43] Control experiments were carried out simultaneously by replacing the test drugs (new compounds and reference inhibitors) with appropriate dilutions of the vehicles. In addition, the possible capacity of the above test drugs to modify the fluorescence generated in the reaction mixture due to non-enzymatic inhibition (e.g., by direct reaction with the Amplex Red reagent) was determined by adding these drugs to solutions containing

only the Amplex Red reagent in a sodium phosphate buffer. To determine the kinetic parameters of hMAO-A and hMAO-B (K_M and V_{max}), the corresponding activity of both isoforms was evaluated (under the experimental conditions described above) in the presence of a wide range of *p*-tyramine concentrations. The specific fluorescence emission (used to obtain the final results) was calculated after subtraction of the background activity, which was determined from wells containing all components except the hMAO isoforms, which were replaced by a sodium phosphate buffer solution. Under our experimental conditions, this background activity was practically negligible. MAO activity of the test compounds and reference inhibitors is expressed as IC_{50} , i.e., the concentration of each drug required to produce a 50% decrease in control value activity for MAO isoforms.

Determination of inhibition mode: To evaluate whether compounds **1**, **12**, **14**, and **17** are reversible or irreversible hMAO-B inhibitors, a dilution method was used.^[44] A 100 \times concentration of the enzyme used in the above-described experiments was incubated with a concentration of inhibitor equivalent to 10-fold its IC_{50} value. After 30 min, the mixture was diluted 100-fold into reaction buffer containing Amplex Red reagent, horseradish peroxidase, and *p*-tyramine, and the reaction was monitored for 15 min. Reversible inhibitors show linear progress with a slope equal to ~91% of the slope of the control sample, whereas irreversible inhibition reaches only ~9% of this slope. Control tests were carried out by pre-incubating and diluting the enzyme in the absence of inhibitor.

Neuroprotective study: DMSO, phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), Hanks buffer, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), and H_2O_2 were acquired from Sigma–Aldrich (Alcobendas). Poly-D-lysine, neurobasal medium, L-glutamine, B-27, and fetal bovine serum (FBS) were acquired from Gibco/Invitrogen S.A., Barcelona, Spain.

Primary culture of neurons and glia: Pregnant rats (19–20 days) were euthanized by CO_2 inhalation, and embryos were immediately extracted from the womb by caesarean section, and their brains were carefully dissected out. Meninges were removed, and a portion of motor cortex was isolated after dissection of the brain.^[26] Fragments obtained from several embryos were subjected to mechanic disintegration. Neurobasal medium supplemented with 2% B-27 (for cortical neurons) was used to seed the cells in 96-well plates at a density of 100 000 cells per mL. Neuronal cultures were allowed to grow for 8–10 days in an incubator (Form Direct Heat CO_2 , Thermo Electron Corporation, Madrid, Spain) under saturated humidity at a partial pressure of 5% CO_2 in air at 37 °C. Experiments were conducted on female Wistar Kyoto (WKY) rats, obtained from the rat colony maintained at the animal facilities of our department. Rats were housed, cared for, and acclimatized (before the experiments). All experiments were carried out in accordance with European regulations on the protection of animals (Directive 2010/63/UE), the Spanish Real Decreto 53/2013 (1.Febrero) and/or the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as adopted and promulgated by the USA.

Determination of neuronal survival: Neuronal cultures were treated with the compounds in the study at 100 μ M (final DMSO concentration \leq 1%) or with studied compounds and H_2O_2 (30 μ M) over an incubation period of 24 h. H_2O_2 was used as reference neurotoxic agent for neurons. Cell viability was determined to gauge the possible cytotoxicity of new compounds or their neuroprotective effects against a pro-oxidant (H_2O_2) agent, by reducing MTT to formazan via the mitochondria of viable cells. MTT (5 mg mL^{–1} in

Hanks buffer) was added to each well to a final concentration of 10%.^[52] After incubating for 2 h at 37 °C, the medium was removed, and formazan crystals formed were suspended in DMSO (100 $\mu\text{L well}^{-1}$). The production of formazan by viable cells was quantified at 37 °C in an absorbance reader (Fluo-star Optima, BMG LABTECH, Offenburg, Germany) by measuring the absorbance at λ 570 nm).^[53,54] In addition, the possible capacity of the above test drugs to modify the absorbance generated by reaction with MTT was determined by adding these drugs to solutions containing only MTT reagent in neurobasal medium.

Neutralization of free radicals: DMSO, DPPH, L-ascorbic acid (vitamin C), and EtOH were acquired from Sigma-Aldrich (Alcobendas). The DPPH· radical scavenging activity of each compound was determined as previously described, with minor modifications. The DPPH· radical was dissolved in EtOH (100 μM) and 99 μL of the solutions were transferred to each well of a 96-well microplate. Compounds **3**, **7**, **9**, **14**, and **15** (1 μL , 100 μM , final concentration) in EtOH were added to each well of a 96-well microplate, and the mixtures were incubated at room temperature for 30 min. Vitamin C (100 μM) was used as a positive control in the experiments. The absorbance at 540 nm was measured using a microplate reader. The radical-scavenging activity of each compound was estimated by comparing the DPPH· absorbance value in the antioxidant–radical reaction mixture after subtraction of the background activity.^[55–57]

In vitro blood–brain barrier permeation assay: Hydrocortisone, desipramine, promazine, aldosterone, caffeine, ofloxacin, corticosterone, imipramine, testosterone, verapamil, piroxicam, lipid pig brain, PBS (pH 7.4), and dodecane were purchased from Sigma-Aldrich (Alcobendas) and Acros (Madrid, Spain). Prediction of the brain penetration was evaluated using a PAMPA BBB assay, in a manner similar to that described previously.^[46–49] Pipetting was performed with a semiautomatic pipetter (CyBi-SELMA), and UV reading with a microplate spectrophotometer (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Co.). Millex filter units (PVDF membrane, diameter 25 mm, pore size 0.45 μm) were acquired from Millipore. The porcine brain lipid (PBL) was obtained from Avanti Polar Lipids. The donor microplate was a 96-well filter plate (PVDF membrane, pore size 0.45 μm), and the acceptor microplate was an indented 96-well plate, both from Millipore. The acceptor 96-well microplate was filled with 200 μL PBS/EtOH (70:30), and the filter surface of the donor microplate was impregnated with 4 mL PBL in dodecane (20 mg mL^{-1}). Compounds were dissolved in PBS/EtOH (70:30) at 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, filtered through a Millex filter, and then added to the donor wells (200 μL). The donor filter plate was carefully placed on the acceptor plate to form a sandwich, which was left undisturbed for 240 min at 25 °C. After incubation, the donor plate was carefully removed, and the concentration of compounds in the acceptor wells was determined by UV/Vis spectroscopy. Every sample was analyzed at five wavelengths, in four wells and in at least three independent runs, and the results are given as the mean \pm standard deviation. In each experiment, 10 quality control standards of known BBB permeability were included to validate the analysis set.

Theoretical evaluation of ADME properties: The absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) properties of the studied compounds were calculated using the Molinspiration software package. LogP values were calculated using the methodology developed by Molinspiration as a sum of fragment-based contributions and correction factors.^[50] TPSA was calculated based on the methodology published by Ertl et al. as a sum of fragment contributions.^[58] Oxygen and nitrogen-centered polar fragments were considered.^[50] PSA has been shown to be a very good descriptor

for characterizing drug absorption, including intestinal absorption, bioavailability, Caco-2 permeability, and blood–brain barrier penetration. The method for calculation of molecular volume developed at Molinspiration is based on group contributions. These were obtained by fitting the sum of fragment contributions to ‘real’ three-dimensional (3D) volume for a training set of $\sim 12\,000$ mostly drug-like molecules; 3D molecular geometries for a training set were fully optimized by the semi-empirical AM1 method.

Statistics: Results are expressed as the mean of at least three experiments \pm SEM or \pm SD for blood–brain barrier permeation assay. Statistically significant differences between two measurements ($P < 0.05$, $P < 0.01$, or $P < 0.001$) were determined by analysis of variance (ANOVA) followed by the multiple comparison Dunnett’s test. Graphical representation, statistical analysis, and calculation of IC_{50} values were performed with GraphPad Prism software (ver. 4.03, San Diego, CA, USA).

Acknowledgements

This work was supported in part by the University of Santiago de Compostela, the Xunta de Galicia (EM2014/016), the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2012-31035), the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT), and QREN (FCUP-CIQ-UP-NORTE-07-0124-FEDER-000065), Galician Plan of Research, Innovation and Growth 2011–2015 (Plan I2C-ED481B 2014/086-0) and FCT, POPH, and QREN (SFRH/BPD/95345/2013).

Keywords: coumarin • inhibitors • monoamine oxidase • neuroprotection • Parkinson’s disease

- [1] D. S. Philip, S. Zimmerman, C. Suchindran, P. Reed, L. Wang, M. Boustani, S. Sudha, *Annu. Rev. Public Health* **2002**, *23*, 213–231.
- [2] K. A. Jellinger, *J. Neural Transm. Suppl.* **2003**, *65*, 101–144.
- [3] L. A. Rabin, C. Wang, M. J. Katz, C. A. Derby, H. Buschke, B. Lipton, *J. Am. Geriatr. Soc.* **2012**, *60*, 1128–1134.
- [4] J. Birks, *Cochrane Database Syst. Rev.* **2006**, *1*, CD005593.
- [5] A. H. Schapira, P. Jenner, *Mov. Disord.* **2011**, *26*, 1049–1105.
- [6] J. Blesa, I. Trigo-Damas, A. Quiroga-Varela, V. R. Jackson-Lewis, *Front. Neuroanat.* **2015**, *8*, 9–91.
- [7] D. Lecca, D. K. Nevin, G. Mulas, M. A. Casu, A. Diana, D. Rossi, G. Sacchetti, A. R. Carta, *Neuroscience* **2015**, *302*, 23–35.
- [8] Y. Wu, K. Kazumura, W. Maruyama, T. Osawa, M. Naoi, *J. Neural Transm.* **2015**, *122*, 1399–1407.
- [9] H. Jiménez-Urbiet, B. Gago, P. de la Riva, M. Delgado-Alvarado, C. Marin, M. C. Rodríguez-Oroz, *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2015**, *56*, 294–314.
- [10] P. Jenner, *Ann. Neurol.* **2003**, *53*, S26–S38.
- [11] F. I. Tarazi, Z. T. Sahli, M. Wolny, S. A. Mousa, *Pharmacol. Ther.* **2014**, *144*, 123–133.
- [12] R. D. H. Murray, J. Méndez, S. A. Brown in *The Natural Coumarins: Occurrence, Chemistry and Biochemistry*, John Wiley & Sons, New York, **1982**, pp. 21.
- [13] F. Borges, F. Roleira, N. Milhazes, E. Uriarte, L. Santana, *Front. Med. Chem.* **2009**, *4*, 23–85.
- [14] K. N. Venugopala, V. Rashmi, B. Odhav, *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*, 1–14.
- [15] G. Melagraki, A. Afantitis, O. Igglessi-Markopoulou, A. Detsi, M. Koufaki, C. Kontogiorgis, D. J. Hadjipavlou-Litina, *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3020–3026.
- [16] C. Garino, N. Pietrancosta, Y. Laras, V. Moret, A. Rolland, G. Quéléver, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1995–1999.
- [17] M. Sun, J. Hu, X. Song, D. Wu, L. Kong, Y. Sun, *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *67*, 39–53.

- [18] Y. R. Prasad, P. R. Kumar, C. A. Deepti, M. V. Ramana, *Asian J. Chem.* **2007**, *19*, 4790–4798.
- [19] K. M. Amin, D. E. A. Rahman, Y. A. Al-Eryani, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5377–5388.
- [20] M. Gellert, M. H. O'Dea, T. Itoh, J. I. Tomizawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 4474–4478.
- [21] L. M. Bedoya, M. Beltran, R. Sancho, D. A. Olmedo, E. Olmo, J. L. López-Pérez, E. Muñoz, A. San Feliciano, J. Alcamí, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4447–4450.
- [22] P. Valenti, A. Rampa, M. Recanatini, A. Bisi, F. Belluti, P. Da Re, M. Carrara, L. Cima, *Anti-Cancer Drug Des.* **1997**, *12*, 443–451.
- [23] D. Yang, T. Gu, T. Wang, Q. Tang, C. Ma, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2010**, *74*, 1430–1434.
- [24] D. S. Whitton, J. A. Sadowski, J. W. Suttie, *Biochemistry* **1978**, *17*, 1371–1377.
- [25] P. E. Nguetefack-Mbuyo, T. B. Nguetefack, A. B. Dongmo, S. Afkir, A. G. Azebaze, T. Dimo, A. Legssyer, A. Kamanyi, A. Ziyat, *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *117*, 446–450.
- [26] L. Piazzzi, A. Rampa, A. Bisi, S. Gobbi, F. Belluti, A. Cavalli, M. Bartolini, V. Andrisano, P. Valenti, M. Recanatini, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2279–2282.
- [27] B. S. Yun, I. K. Lee, I. J. Ryoo, I. D. Yoo, *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1238–1240.
- [28] M. J. Matos, C. Terán, Y. Pérez-Castillo, E. Uriarte, L. Santana, D. Viña, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7127–7137.
- [29] D. Viña, M. J. Matos, M. Yáñez, L. Santana, E. Uriarte, *MedChemComm* **2012**, *3*, 213–218.
- [30] M. J. Matos, S. Vázquez-Rodríguez, E. Uriarte, L. Santana, D. Viña, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4224–4227.
- [31] M. J. Matos, D. Viña, S. Vázquez-Rodríguez, E. Uriarte, L. Santana, *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12*, 2210–2239.
- [32] D. Viña, M. J. Matos, G. Ferino, E. Cadoni, R. Laguna, F. Borges, E. Uriarte, L. Santana, *ChemMedChem* **2012**, *7*, 464–470.
- [33] M. J. Matos, S. Vilar, R. M. González-Franco, E. Uriarte, L. Santana, C. Friedman, N. P. Tatonetti, D. Viña, J. A. Fontenla, *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 151–161.
- [34] M. J. Matos, F. Pérez-Cruz, S. Vázquez-Rodríguez, E. Uriarte, L. Santana, F. Borges, C. Olea-Azar, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 3900–3906.
- [35] M. J. Matos, A. Gaspar, S. Kachler, K.-N. Klotz, F. Borges, L. Santana, E. Uriarte, *J. Pharm. Pharmacol.* **2013**, *65*, 30–34.
- [36] C. S. Barnes, M. I. Strong, J. L. Occolowitz, *Tetrahedron* **1963**, *19*, 839–847.
- [37] J. W. Hinman, E. L. Caron, H. Hoeksema, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 3789–3800.
- [38] G. Rodighiero, C. Antonello, *Boll. Chim. Farm.* **1958**, *97*, 592–601.
- [39] K. Okumura, *Yakugaku Zasshi* **1960**, *80*, 525–532.
- [40] T. Patonay, G. Litkei, R. Bogner, J. Erdei, C. Miszt, *Pharmazie* **1984**, *39*, 84–91.
- [41] V. Maddi, S. N. Mamledesai, D. Satyanarayana, S. Swamy, *Indian J. Pharm. Sci.* **2007**, *69*, 847–849.
- [42] E. Klusmann, W. Rosenthal, J. Rademann, F. Christian (Forschungsverbund Berlin Ev), Int. PCT Pub. No. WO 2006122546 A1 20061123, **2006**.
- [43] M. Yáñez, N. Fraiz, E. Cano, F. Orallo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *344*, 688–695.
- [44] R. A. Copeland, *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*, Wiley-Interscience, Hoboken, **2005**.
- [45] M. Gerlach, P. Riederer, M. B. Youdim, *Eur. J. Pharmacol.* **1992**, *226*, 97–108.
- [46] L. Di, E. H. Kerns, K. Fan, O. J. McConnell, G. T. Carter, *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 223–232.
- [47] M. I. Rodríguez-Franco, M. I. Fernández-Bachiller, C. Pérez, B. Hernández-Ledesma, B. Bartolomé, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 459–462.
- [48] M. I. Fernández-Bachiller, C. Pérez, L. Monjas, J. Rademann, M. I. Rodríguez-Franco, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1303–1317.
- [49] B. López-Iglesias, C. Pérez, J. A. Morales-García, S. Alonso-Gil, A. Pérez-Castillo, A. Romero, M. G. López, M. Villarroja, S. Conde, M. I. Rodríguez-Franco, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 3773–3785.
- [50] M. cheminformatics, Bratislava, Slovak Republic, www.molinspiration.com/services/properties.html (accessed January 2015).
- [51] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *23*, 3–26.
- [52] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.
- [53] K. Saar, M. Lindgren, M. Hansen, E. Eiríksdóttir, Y. Jiang, K. Rosenthal-Aizman, M. Sassian, U. Langel, *Anal. Biochem.* **2005**, *345*, 55–65.
- [54] P. Lundin, S. El Andaloussi, Ü. Langel, *Methods Mol. Biol.* **2011**, *683*, 195–205.
- [55] P. Molyneux, *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **2004**, *26*, 211–219.
- [56] W. Zhong, N. Liu, Y. Xie, Y. Zhao, *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *60*, 355–359.
- [57] X. Jia, L. Dong, Y. Yang, S. Yuan, Z. Zhang, M. Yuan, *Carbohydr. Polym.* **2013**, *95*, 195–199.
- [58] P. Ertl, B. Rohde, P. Selzer, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3714–3717.

Received: September 7, 2015

Revised: October 13, 2015

Published online on October 23, 2015





Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl

Potent and selective MAO-B inhibitory activity: Amino- versus nitro-3-arylcoumarin derivatives



Maria João Matos^{a,*}, Fernanda Rodríguez-Enríquez^b, Santiago Vilar^{a,c}, Lourdes Santana^a, Eugenio Uriarte^a, George Hripcsak^c, Martín Estrada^d, María Isabel Rodríguez-Franco^d, Dolores Viña^b

^a Departamento de Química Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

^b Departamento de Farmacología, CIMUS, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

^c Department of Biomedical Informatics, Columbia University Medical Center, 10032 New York, USA

^d Instituto de Química Médica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQM-CSIC), C/Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 October 2014

Revised 1 December 2014

Accepted 1 December 2014

Available online 8 December 2014

Keywords:

3-Arylcoumarins

Perkin reaction

Monoamine oxidase inhibitors

PAMPA assay

ADME theoretical properties

Docking studies

ABSTRACT

In this study we synthesized and evaluated a new series of amino and nitro 3-arylcoumarins as hMAO-A and hMAO-B inhibitors. Compounds **2**, **3**, **5** and **6** presented a better activity and selectivity profile against the hMAO-B isoform (IC₅₀ values between 2 and 6 nM) than selegiline. In general, the amino derivatives (**4–6**) proved to be more selective against MAO-B than the nitro derivatives (**1–3**). Additionally, a theoretical study of some physicochemical properties, PAMPA and reversibility assays for the most potent derivative, and molecular docking simulations were carried out to further explain the pharmacological results, and to identify the hypothetical binding mode for the compounds inside the hMAO-B.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Neurodegeneration is a large class of chronic and progressive nervous system biochemical processes based on constitutional neuronal degeneration. The wrong regulation of these processes leads to different neurodegenerative diseases (ND), such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), amyotrophic lateral sclerosis, and Huntington disease.¹ Among them, AD and PD are the most prevalent. The etiology of these diseases is not completely known, but several risk factors have been identified, including environmental factors, genetics, and age.^{1,2} Several research hypotheses exist regarding the pathogenesis, including different mechanisms that may be involved in the development of the disease, such as oxidative stress, inflammation, excitotoxicity, mitochondrial dysfunction and proteolytic stress.² These pathologies severely influence the life quality of the elderly.³ Therefore, studies in the area are continuously improving.

PD, the second most important ND, is characterized by loss of dopaminergic neurons in the nigrostriatal pathway. These neurons extend from the zona compacta of the substantia nigra (SNc) to the striatum.³ The symptoms of PD, resting tremor, rigidity and bradykinesia, appear when about 80% of dopaminergic neurons have been destroyed.⁴ In the 50s, dopamine (DA) was described as a

neurotransmitter, which showed low levels in the basal ganglia in animal models of Parkinsonism. After the success of a placebo-controlled trial, levodopa (LD) became an essential drug for the treatment of PD.⁵ Even today the standard treatment of PD is the combination of LD with inhibitors of peripheral dopa decarboxylase (DDC), to avoid the formation of DA in the periphery.⁵ LD is also associated to inhibitors of the enzyme catechol-O-methyltransferase (COMT) and prevents the formation of 3-O-methyldopa (3-OMD).⁶ Among other drugs that can be used to treat PD, selective inhibitors of monoamine oxidase B (MAO-B) play an important role.^{7,8} MAO-B metabolizes approximately 80% of the DA in the SNc, without affecting the serotonin or noradrenaline metabolism. MAO is a flavin-containing enzyme bound to the mitochondrial outer membrane of neuronal, glial, and other cells, which is responsible for the oxidative deamination of endogenous monoamine neurotransmitters, trace amines, and a number of amine xenobiotics.⁹ This enzyme exists in two distinct enzymatic isoforms, namely MAO-A and MAO-B encoded by different genes and distributed in diverse tissues.¹⁰ Increased activity of MAO-A and MAO-B is associated with loss of endogenous and exogenous monoamine amounts.

An increase in MAO-B activity is also associated with gliosis, which can result in high levels of hydrogen peroxide and oxidative free radicals. Evidence exists that as aging progresses activity of

* Corresponding author. Tel.: +34 881 814936; fax: +34 981 544912.

E-mail address: mariacmatos@gmail.com (M.J. Matos).

MAO-B in the brain increases, but not so for MAO-A.⁸ The largest increases are in the basal ganglia and thalamus, followed by the frontal cortex and, to a lesser extent, cerebellum and parietal and temporal cortices.¹¹

Some studies have demonstrated the preliminary dominance of coumarin compounds in the treatment of AD and PD for improving the elderly's life quality. Coumarins represent an important family of naturally occurring¹² and/or synthetic oxygen-containing heterocycles, bearing a typical benzopyrone framework.¹³ Therefore, coumarinic compounds are a class of lactones structurally constructed by a benzene ring fused α -pyrone ring, and essentially possess π - π conjugated system with rich electron and good charge-transport properties.¹⁴ The simplicity and versatility of the coumarin scaffold make it an interesting starting-point for a wide range of biological applications.^{15,16} Moreover, a significant number of coumarin compounds are being actively developed as medicinal candidates or drugs with strong pharmacological activity, low toxicity and fewer side-effects, lower drug resistance, high bioavailability, broad spectrum and better curative effects, etc.¹⁷ Several efforts have been made mainly in developing coumarin-based anticoagulant, antioxidant, antimicrobial (antiviral, antifungal and antiparasitic), anticancer, antidiabetic, analgesic, anti-neurodegenerative and anti-inflammatory agents.^{18–23} Nowadays, some coumarins proved to be enzymatic inhibitory agents [MAO inhibitors, acetylcholinesterase (AChE) inhibitors and butyrylcholinesterase (BuChE) inhibitors] with potential in ND.^{24–27} These studies represent an important tendency in the coumarin's chemistry and biological evaluation.^{28,29}

Early literature reported that electron delocalization and polarizability as well as hydrophobicity were crucial physical factors for MAO inhibitors.³⁰ The fused coumarins with large conjugated system demonstrated better MAO-B inhibitory activity than the reference compounds. Therefore, fused coumarins are also worthy of further investigation as potential MAO-B inhibitors.³¹ Some interesting structure-activity relationships were concluded from these studies. Literature has also reported that some compounds with acyl or benzyloxy substituted group linked to C-3 or C-7 position at the coumarin ring possess the ability to improve inhibitory activity and selectivity towards MAO-B.³²

In addition, previous work has been done by our group modulating the positions 3 and 6 of the coumarin ring with different substituents.^{33,34} Our research group has reported, in several studies, the importance of the MAO inhibitory activity of different substituents on the phenyl ring at position 3 of the 3-arylcoumarins in the PD.^{35–37} Comparative studies suggested that substitutions (methoxy and methyl groups, and bromine atoms) at *meta* and *para* positions of the 3-aryl group played an important role in exerting the biological activity and selectivity against MAO-B. Several compounds proved to be better than the reference compounds selegiline and rasagiline. Other substitutions on this moiety that can modulate also the activity and selectivity against MAO enzymes were also studied by our group.³⁸ Different substitutions of the coumarin nucleus at 3-position result in different activity

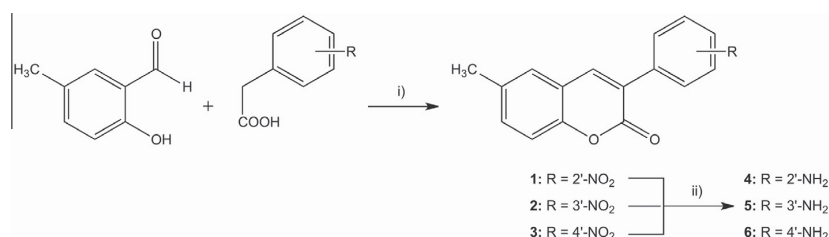
and selectivity to MAO-B, also those derivatives with different heterocyclic rings in this position possess potency and selectivity towards MAO-B.³⁹

Therefore, almost all the studied derivatives might be considered as potential lead compounds for treating PD. Taking into account this previous results, the introduction of nitro and amino groups in the 3-aryl ring of 3-arylcoumarins seems to be of high interest. A comparison between both substituents in different positions was performed in this new study. Docking calculations were an important tool to support and better understand the results, and also to the rational design of new derivatives.

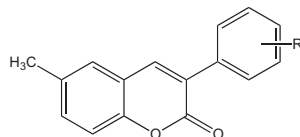
6-Methyl-3-nitrophenylcoumarins **1–3** were synthesized starting from the commercially available 5-methylsalicylaldehyde and the respectively substituted 3-nitrophenylacetic acids by a modified Perkin reaction, in good yields (70–80%). The amino-derivatives **4–6** were obtained, in very good yield (92–97%), from **1** to **3**, respectively, in a palladium/carbon catalyzed reaction (Scheme 1).^{40–42}

The biological evaluation of the test drugs on hMAO activity was investigated by measuring their effects on the production of H₂O₂ from *p*-tyramine (a common substrate for hMAO-A and hMAO-B), using the Amplex[®] Red MAO assay kit and microsomal MAO isoforms prepared from insect cells (BTI-TN-5B1-4) infected with recombinant baculovirus containing cDNA inserts for hMAO-A or hMAO-B.^{43,44} New compounds and reference inhibitors were unable to react directly with the Amplex[®] Red reagent, which indicates that these drugs do not interfere with the measurements. On the other hand, in the experiments and under the experimental conditions, hMAO-A displayed a Michaelis constant (K_m) equal to $457.17 \pm 38.62 \mu\text{M}$ and a maximum reaction velocity (V_{max}) in the control group of 185.67 ± 12.06 (nmol *p*-tyramine/min)/mg protein, whereas hMAO-B showed a K_m of $220.33 \pm 32.80 \mu\text{M}$ and V_{max} of 24.32 ± 1.97 (nmol *p*-tyramine/min)/mg protein ($n = 5$). Most tested compounds concentration-dependently inhibited this enzymatic control activity (Table 1).

A basic condition of any compound to act on neurodegenerative processes is to penetrate into the brain, that is, to be able to cross the blood–brain barrier (BBB). To examine the capability of our compounds to pass this barrier, we selected compound **3**, the most active, with a nitro group in the phenyl at 3-position, and used a parallel artificial membrane model.²⁷ This is a fairly easy and successful method to predict the passive central nervous system (CNS) permeation, which had been previously optimized in order to be applied to investigational compounds with limited aqueous solubility.^{45–47} The permeability of compounds **3** through a lipid extract of porcine brain were determined using a mixture 70:30 of phosphate buffered saline solution and ethanol (PBS/EtOH). In each experiment 10 commercial drugs were also evaluated for assay validation. The graphic representation of experimental permeability versus reported values of such well-known drugs gave a lineal correlation, Pe (exptl) = $0.69 Pe$ (bibl) + 6.61 ($R^2 = 0.812$). From this equation and taking into account the described limits for BBB permeation, we established that compounds with



Scheme 1. Synthesis of 3-arylcoumarins. Reagents and conditions: (i) NaH, Ac₂O, rt, 20 h; (ii) H₂, Pd/C, ethanol, rt, 3 h.

Table 1hMAO-A and hMAO-B in vitro inhibitory activity of the synthesized derivatives **1–6** and reference compounds^a

Compd	R	IC ₅₀ hMAO-A (nM)	IC ₅₀ hMAO-B (nM)	S.I. ^b
1	2'-NO ₂	*	5.52 × 10 ³ ± 0.30 × 10 ³	>18 ^d
2	3'-NO ₂	*	6.00 ± 0.40	>16,667 ^d
3	4'-NO ₂	4.18 × 10 ³ ± 0.28 × 10 ^{3c}	2.10 ± 0.10	2090
4	2'-NH ₂	*	2.17 × 10 ³ ± 0.15 × 10 ³	>46 ^d
5	3'-NH ₂	*	2.20 ± 0.13	>50,000 ^d
6	4'-NH ₂	*	4.10 ± 0.27	>25,000 ^d
Selegiline	—	67.25 × 10 ³ ± 1.02 × 10 ^{3c}	19.60 ± 0.86	3431
Moclobemide	—	361.38 ± 19.30	*	<0.0036 ^d

^a Each IC₅₀ value is the mean ± SEM from five experiments (n = 5).^b Selectivity index: MAO-B selectivity ratios [IC₅₀ (MAO-A)]/[IC₅₀ (MAO-B)] for inhibitory effects of both new compounds and reference inhibitors.^c p < 0.01 regarding the corresponding IC₅₀ obtained against MAO-B as determined by ANOVA/Dunnett's.^d Values obtained under the assumption that the corresponding IC₅₀ against either MAO-A or MAO-B is greater than 100 μM.

* Inactive at 100 μM (highest concentration tested).

Table 2Structural properties of the 3-aryl-6-methylcoumarin derivatives **1–6**, and the reference compounds.

Compd	LogP ^a	MW ^b (Da)	TPSA ^c (Å ²)	nOH ^d	nOHNH ^d	Volume ^e (Å ³)
1	4.07	281.27	76.04	5	0	239.89
2	4.10	281.27	76.04	5	0	239.89
3	4.12	281.27	76.04	5	0	239.89
4	3.60	251.28	56.23	3	2	227.84
5	3.21	251.28	56.23	3	2	227.84
6	3.24	251.28	56.23	3	2	227.84
Selegiline	2.64	187.29	3.24	1	0	202.64
Moclobemide	1.68	268.74	41.57	4	1	240.70

^a LogP—expressed as the logarithm of octanol/water partition coefficient.^b MW—molecular weight.^c TPSA—topological polar surface area.^d Number of hydrogen bond acceptors (nOH) and donors (nOHNH).^e Molecular volume.

permeability values above 9.36·10⁻⁶ cm s⁻¹ could penetrate into the CNS by passive diffusion (CNS+), whereas products with *Pe* below 7.98·10⁻⁶ cm s⁻¹ could not enter (CNS-). Between these values, the CNS permeation was considered uncertain (CNS+/-). So, compound **3** (*Pe* = 10.5·10⁻⁶ cm s⁻¹) would be able to cross BBB and reach its therapeutic targets.⁴⁸

In order to better understand the overall properties and the drug-like characteristics of compounds **1–6**, we carried out the calculation with Molinspiration software of the lipophilicity (expressed as the octanol/water partition coefficient and herein called log*P*), and the theoretical prediction of other ADME properties (molecular weight, TPSA, number of hydrogen donors and acceptors, and volume) (see Table 2).^{49–51}

Reversibility experiments were performed to evaluate the type of inhibition of derivative **3**, the most active compound in the series (Table 3). An effective dilution method was used,^{52,53} and selegiline (irreversible inhibitor) and isatin (reversible inhibitor) were taken as standards.⁵⁴ Reversibility of the inhibition shown by compound **3** is even higher than that shown for isatin.

We also performed molecular docking simulations in the hMAO-B to detect the hypothetical binding mode for the 3-aryl-coumarin derivatives **1–6** and explain their structure–activity relationship.^{55–57} We used a similar protocol to previous studies.⁵⁸ We docked the compounds to the crystallized hMAO-B protein structure (PDB:2V60)⁵⁷ using Glide SP (Standard Precision mode).⁵⁶ Five poses for each compound were extracted from the docking. The

Table 3Reversibility results of hMAO-B inhibition by derivative **3** and reference inhibitors

Compd	Slope (AUF/t) ^a (%)
3 (2.5 nM)	79.98 ± 5.33
Selegiline (20 nM)	8.51 ± 0.60
Isatin (35 μM)	64.71 ± 4.32

^a Percentage values represent the mean ± SEM of three experiments (n = 3) relative to control; data show recovery of hMAO-B activity after dilution.

best pose was optimized using Prime MM-GBSA⁵⁶ along with the protein pocket (see Methods for a detailed description). To validate our protocol we calculated the root mean square deviation (RMSD) between the co-crystallized and the theoretical poses for the coumarins in 2V60 and 2V61.⁵⁷ RMSD values were 0.82 and 1.15, respectively.

As previous results for coumarin derivatives, the poses determined through molecular docking for the most of the studied compounds placed the benzopyrone ring with the carbonyl group oriented towards the bottom of the cavity. The methyl substituent at position 6 is oriented towards the FAD cofactor whereas the 3-aryl ring is placed in the hydrophobic entrance cavity. Compounds also established a hydrogen bond between the carbonyl oxygen and the residue Cys172. This described binding mode was found for compounds **2–6**, showing the preference for this type of molecules to adopt the described conformation when interacting with

the protein. However, docking for compound **1** (*ortho*-nitro) did not yield any poses as the one described. Figures 1 and 2 showed the proposed binding mode extracted from the docking calculations for compounds **1–6**. The different binding mode proposed for the derivative **1** could be highly responsible for the loss of hMAO-B activity. Leu171 showed lower *van der Waals* interactions with compound **1**, compared to compounds **2** and **3** with *meta* and *para* substituents (Fig. 3a–Supplementary material). Residue Coulomb contributions also showed a different profile between compound **1** and compounds **2** and **3**.

For instance, Phe168 and Tyr435 exhibited poor Coulomb interaction energies with compound **1** whereas the residues Glu84 and Pro102 showed higher Coulomb interaction energies (Fig. 3b–Supplementary material).

Figure 2 shows the theoretical binding modes determined by compounds **4–6** along with the important residues interacting with the ligands. As an example, compound **5** establishes *van der Waals* interactions mainly with the residues Tyr326, Ile199, Leu171, Gln206, Cys172, Ile198, Phe168 and Ile316. Analysis of

the binding mode showed important Coulomb contributions for residues Tyr326, Glu84 and Ile199. Compound **5** also showed a hydrogen bond between the carbonyl oxygen and the residue Cys172. Ligand conformation is also stabilized through different H-arene interactions between the ligand and the residues Leu171, Ile199 and Tyr326. However, in the comparison between compounds **4–6**, compound **4** (*ortho*-amino) is slightly shifted towards the FAD cofactor (Fig. 2d). Although the *ortho*-amino could establish a hydrogen bond with Tyr326, the pose determined for compound **4** would cause the disruption of some H-arene interactions, such as the interaction between the phenyl ring in Tyr326 and the hydrogen at position **4** in the coumarin ring.

Moreover, compounds **4–6** had some differences in the *van der Waals* and Coulomb energetic protein residue contributions. Compound **4** (*ortho*-amino) showed a drastic loss of *van der Waals* energy contribution with the residue Tyr326, compared to compounds **5** and **6** with *meta* and *para* amino substituents (Fig. 4a–Supplementary material). Moreover, lower *van der Waals* contributions were captured in residues Leu171 and Cys172 for compound **4**. Coulomb interactions were also decreased for compound **4** in residues Glu84 and Cys172. However, Gln206 and Tyr326 exhibited more important electrostatic contributions in the interaction between compound **4** and the hMAO-B protein (Fig. 4b–Supplementary material). The amino substituent at *ortho* position could cause a small displacement of the coumarin nucleus with the consequent disruption of some stabilizer interactions with the protein and decreasing hMAO-B activity.

As represented in Table 1, most of the studied compounds showed a selective inhibitory activity against MAO-B in the nanomolar or micromolar range. The amino derivatives (**4–6**) proved to be slightly more selective against MAO-B than the nitro derivatives (**1–3**). The lowest IC₅₀ values were obtained for compounds **2**, **3**, **5** and **6** (*meta* and *para* derivative compounds), being the IC₅₀ values in the low nanomolar range. In particular, compound **5** proved to be more than 9-fold more active and more than 12-fold more selective than selegiline, used as reference compound. Compounds **1** and **4**, with IC₅₀ values on the micromolar range, present on their structure a single substituent (NO₂ or NH₂, respectively) in *ortho* position of the phenyl at position 3. These results are consistent with those previously described for other 6-substituted-3-phenylcoumarins for which it was observed that the presence of substituents in *ortho* position produced a decrease in the MAO-B inhibitory activity (36). Compound **3** was the only exception observed for this series, presenting activity against the MAO-A isoenzyme (IC₅₀ MAO-A = 4.18 μM).

From the data presented in Table 2, it is significant that almost all the derivatives described possess log*P* values compatible with those required to cross membranes. TPSA, described to be a predictive indicator of membrane penetration, was also found to be positive. In addition, it can be observed that no violations of Lipinski's rule (molecular weight, log*P*, number of hydrogen donors and acceptors) were found. As MAO inhibitors have to pass different membranes and reach the central nervous system, this information supports the potential of these derivatives. In addition, parallel artificial membrane permeation (PAMPA) assays were performed for compound **3**, the most active derivative of the series. This compound proved to cross the BBB.

Compounds with *meta* and *para* substituents were well accommodated inside the hMAO-B protein pocket. The studied series showed a hypothetical binding mode that orientates the coumarin ring toward the FAD cofactor and the 3-aryl ring toward the hydrophobic entrance cavity. Carbonyl in the coumarin ring is placed in the bottom of the pocket and showed good availability to establish a hydrogen bond with the residue Cys172. However, the compounds with *ortho* substituents showed some differences according to docking simulations. Compound **1** did not yield any

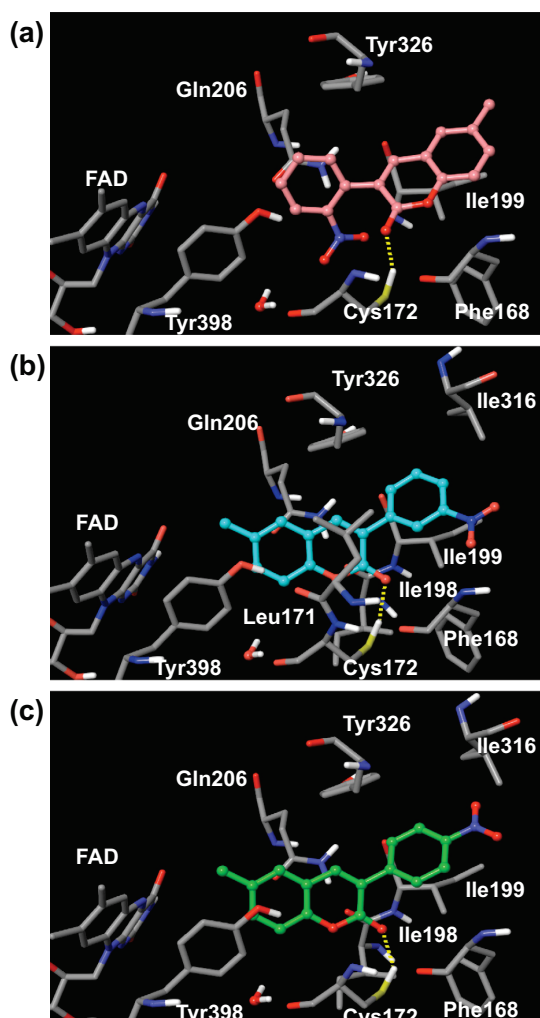


Figure 1. Hypothetical binding mode extracted from docking calculations for compound **1** (a), **2** (b) and **3**(c). Hydrogen bonds between the compounds and the residue Cys172 are highlighted in yellow. Main residues interacting with the ligands are represented in tube.

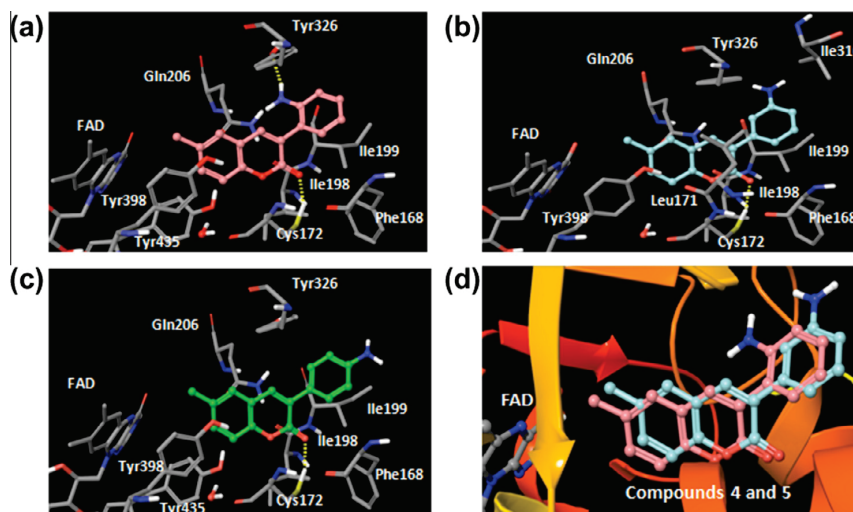


Figure 2. Hypothetical binding mode calculated with molecular docking for compound **4** (a), **5** (b) and **6** (c) along with the main residues (tube) that interact with the respective ligands. Hydrogen bonds with the residue Cys172 are highlighted in yellow. Compound **4** (a) also showed a hydrogen bond with the residue Tyr326. Panel (d) shows the superposition of compounds **4** (pink color) and **5** (turquoise) inside the hMAO-B pocket. Compound **4** is slightly shifted towards the FAD cofactor.

poses as the previously described showing a completely different binding mode that could condition the interaction with the hMAO-B. Moreover, although the pose shown by compound **4** is similar to the respective poses in compounds **5** and **6**, the *ortho*-amino substituent established a hydrogen bond with the residue Tyr326 but at the same time led to a displacement of the coumarin nucleus towards the FAD and caused the disruption of some stabilizing interactions with Tyr326, Leu171 and Cys172. Binding conformations described in this article are in agreement with previous studies.^{36,37,59,60}

Most of the studied compounds presenting structure of 3-aryl-coumarin **1–6** behaved as potent and selective MAO-B inhibitors *in vitro*. These studies showed that *para* and *meta* derivatives of both series inhibited the activity of hMAO-B in the low nanomolar range, while *ortho* derivatives inhibited the activity of the same enzyme in the micromolar range. Compound **3** and **5** (IC_{50} = 2.1 and 2.2 nM, respectively) proved to be the most actives of the series, being **5** the most selective one (9-fold more active and 12-fold more selective than selegiline, the reference compound). In general, the amino derivatives proved to be more selective against MAO-B than the nitro derivatives. Molecular docking studies were performed to establish the nature of the interaction between the studied compounds and hMAO enzymes, leading to a rationalization of the experimental results for the synthesized series. Additionally, prediction of ADME-related physicochemical/structural parameters provided a preliminary indication of the great potential of this type of compounds to cross membranes and acting in the CNS. PAMPA assay of one of the best compounds experimentally corroborated these results. The global results encourage us to further explore the potential of this family of derivatives as potential lead candidates for the treatment of PD.

Acknowledgments

This work was partially supported by Spanish Researchers Personal Funds and University of Santiago de Compostela. M.J.M. thanks Fundação para a Ciência e Tecnologia for her postdoctoral grant (SFRH/BPD/95345/2013). S.V. thanks the Plan Galego de Investigación, Innovación e Crecemento 2011–2015 (I2C), European Social Fund (ESF) and Angeles Alvariano Program from

Xunta de Galicia (Spain). M.I.R.-F. thanks the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for financial support (SAF2012-31035).

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.12.001>.

References and notes

- Trippier, P. C.; Labby, K. J.; Hawker, D. D.; Mataka, J. J.; Silverman, R. B. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 3121.
- Meredith, G. E.; Totterdell, S.; Beales, M.; Meshul, C. K. *Exp. Neurol.* **2009**, *219*, 334.
- Zhu, Y.; Xiao, K.; Ma, L.; Xiong, B.; Fu, Y.; Yu, H.; Wang, W.; Wang, X.; Hu, D.; Peng, H.; Li, J.; Gong, Q.; Chai, Q.; Tang, X.; Zang, H.; Li, J.; Shen, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1600.
- Youdim, M. B. H. *Exp. Neurobiol.* **2010**, *19*, 1.
- Yahr, M. D.; Duvoisin, R. C.; Scheer, M. J.; Barrett, R. E.; Hoehn, M. M. *Arch. Neurol.* **1969**, *21*, 343.
- Carlsson, A. J. *Neural Transm.* **2002**, *109*, 777.
- Abel, E. *Physiol. Behav.* **1995**, *57*, 611.
- Engberg, G.; Elebring, T.; Nissbrandt, H. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1991**, *259*, 841.
- Scarpini, E.; Scheltens, P.; Feldman, H. *Lancet Neurol.* **2003**, *2*, 539.
- Bortolato, M.; Chen, K.; Shih, J. C. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1527.
- Nagatsu, T. *Neurotoxicology* **2004**, *25*, 11.
- Venugopala, K. N.; Rashmi, V.; Odhav, B. *BioMed. Res. Int.* **2013**, *2013*, 963248.
- Murray, R. D. H. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **2002**, *83*, 1.
- Borges, F.; Roleira, F.; Milhazes, N.; Santana, L.; Uriarte, E. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 887.
- Qian, L.-L.; Han, X.-E.; Han, H.; Chen, X.-Z.; Yuan, H.-H. *Guangzhou Huagong* **2013**, *41*, 41.
- Zheng, L.; Zhao, T.; Sun, L.-X. *Shizhen Guoyi Guoyao* **2013**, *24*, 714.
- Borges, F.; Roleira, F.; Milhazes, N.; Uriarte, E.; Santana, L. *Front. Med. Chem.* **2009**, *4*, 23.
- Bubols, G. B.; Vianna, D. R.; Medina-Reimon, A.; von Poser, G.; Lamuela-Raventos, R. M.; Eifler-Lima, V. L.; Garcia, S. C. *Mini Rev. Med. Chem.* **2013**, *13*, 318.
- Xia, L.-X.; Wang, Y.-B.; Huang, W.-L.; Qian, H. *Zhongguo Xinyao Zazhi* **2013**, *22*, 2392.
- Kapoor, S. *Cytotechnology* **2013**, *65*, 787.
- Bansal, Y.; Sethi, P.; Bansal, G. *Med. Chem. Res.* **2013**, *22*, 3049.
- O'Kennedy, R. *Biology, Applications and Mode of Action In* Thornes, R. D., Ed.; John Wiley and Sons: New York, USA, 1997.
- Kontogiorgis, C.; Detsi, A.; Hadjipavlou-Litina, D. *Exp. Opin. Therap. Patents* **2012**, *22*, 437.

24. Patil, P. O.; Bari, S. B.; Firke, S. D.; Deshmukh, P. K.; Donda, S. T.; Patil, D. A. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 2434.
25. Anand, P.; Singh, B. *Arch. Pharmacol. Res.* **2013**, *36*, 375.
26. Huang, L.; Su, T.; Li, X. *Curr. Top. Med. Chem.* **2013**, *13*, 1864.
27. Di, L.; Kerns, E. H.; Fan, K.; McConnell, O. J.; Carter, G. T. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 223.
28. Anand, P.; Singh, B.; Singh, N. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1175.
29. Helguera, A. M.; Perez-Machado, G.; Cordeiro, M. N. D. S.; Borges, F. *Mini Rev. Med. Chem.* **2012**, *12*, 907.
30. Pisani, L.; Muncipinto, G.; Miscioscia, T. F.; Nicolotti, O.; Leonetti, F.; Catto, M.; Caccia, C.; Salvati, P.; Soto-Otero, R.; Mendez-Alvarez, E.; Passeleu, C.; Carotti, A. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6685.
31. Secci, D.; Carradori, S.; Bolasco, A.; Chimenti, P.; Yáñez, M.; Ortuso, F.; Alcaro, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4846.
32. Chimenti, P.; Secci, D.; Bolasco, A.; Chimenti, P.; Bizzarri, B.; Granese, A.; Carradori, S.; Yáñez, M.; Orallo, F.; Ortuso, F.; Alcaro, S. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1935.
33. Matos, M. J.; Viña, D.; Vazquez-Rodriguez, S.; Uriarte, E.; Santana, L. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12*, 2210.
34. Santana, L.; González-Díaz, H.; Quezada, E.; Uriarte, E.; Yáñez, M.; Viña, D.; Orallo, F. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6740.
35. Matos, M. J.; Vilar, S.; González-Franco, R. M.; Uriarte, E.; Santana, L.; Friedman, C.; Tatonetti, N. P.; Viña, D.; Fontenla, J. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 151.
36. Ferino, G.; Cadoni, E.; Matos, M. J.; Quezada, E.; Uriarte, E.; Santana, L.; Vilar, S.; Tatonetti, N. P.; Yáñez, M.; Viña, D.; Picciau, C.; Serra, S.; Delogu, G. *Chem. Med. Chem.* **2013**, *8*, 956.
37. Matos, M. J.; Terán, C.; Pérez-Castillo, Y.; Uriarte, E.; Santana, L.; Viña, D. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7127.
38. Viña, D.; Matos, M. J.; Ferino, G.; Cadoni, E.; Laguna, R.; Borges, F.; Uriarte, E.; Santana, L. *Chem. Med. Chem.* **2012**, *7*, 464.
39. Delogu, G.; Picciau, C.; Ferino, G.; Quezada, E.; Podda, G.; Uriarte, E.; Viña, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 1147.
40. Matos, M. J.; Gaspar, A.; Borges, F.; Uriarte, E.; Santana, L. *Org. Prep. Proc. Int.* **2012**, *44*, 522.
41. Rao, D. V.; Sayigh, A. A. R.; Ulrich H. US 3644413 A 19720222, Chem. Abstr., 77, 7318, **1972**.
42. **Chemistry—General methods:** Starting materials and reagents were obtained from commercial suppliers and were used without further purification (Sigma-Aldrich). Melting points (mp) are uncorrected and were determined with a Reichert Kofler thermopan or in capillary tubes in a Büchi 510 apparatus. ¹H NMR (300 MHz) and ¹³C NMR (75.4 MHz) spectra were recorded with a Bruker AMX spectrometer using DMSO-*d*₆ or CDCl₃ as solvent. Chemical shifts (δ) are expressed in ppm using TMS as an internal standard. Coupling constants (J) are expressed in Hz. Spin multiplicities are given as s (singlet), d (doublet), and m (multiplet). Mass spectrometry was carried out with a Hewlett-Packard-5972-MSD spectrometer. Elemental analyses were performed with a PerkinElmer 240B microanalyzer and are within 0.4% of calculated values in all cases. Flash chromatography (FC) was performed on silica gel (Merck 60, 230–400 mesh); analytical TLC was performed on pre-coated silica gel plates (Merck F254). Organic solutions were dried over anhydrous Na₂SO₄. Concentration and evaporation of the solvent after reaction or extraction was carried out on a rotary evaporator (Büchi Rotavapor) operating at reduced pressure. The analytical results showed >95% purity for all compounds.
General procedure for the synthesis of 6-methyl-3-nitrophenylcoumarins 1–3: To a dry 100-mL round-bottomed flask, the *ortho*-hydroxy-5-methylbenzaldehyde (42.5 mmol), the conveniently substituted nitrophenylacetic acid (42.5 mmol) and acetic anhydride (40.1 mL, 0.43 mol) were added. Then, sodium hydride (60% dispersion in mineral oil, 42.5 mmol) was added in small aliquots. After the dissolution of the reagents, precipitation process was observed (2–5 min). The reaction mixture was stirred for 20 h, and then water (7 mL) was added. After the addition of acetic acid (43 mL), the mixture was cooled to 4 °C for 4 h. The resulting precipitate was filtered and washed with cold glacial acetic acid. The acetic acid was then removed as an azeotrope upon addition of 250 mL toluene and evaporated to dryness. The process was repeated three times. The final residue was dried under vacuum and purified by FC (hexane/ethyl acetate 9:1) to give the products **1–3** as beige powders, in yields between 70–80%.
6-Methyl-3-(2'-nitrophenyl)coumarin (1): Yield: 70%. Mp: 95–96 °C. ¹H NMR (300 MHz; DMSO-*d*₆): δ = 2.39 (s, 3H, CH₃), 7.21–7.23 (m, 1H, H-4'), 7.31–7.37 (m, 2H, H-7, H-8), 7.39–7.48 (m, 3H, H-5, H-5', H-6'), 7.63 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H-3'), 7.75 (s, 1H, H-4). ¹³C RMN (75 MHz; DMSO-*d*₆): δ = 20.8, 116.4, 118.7, 123.7, 127.4, 127.8, 128.6, 130.1, 131.4, 132.9, 133.0, 134.2, 135.7, 142.5, 152.2, 160.9. DEPT (75 MHz; DMSO-*d*₆): δ = 20.8, 116.4, 127.4, 127.8, 130.1, 131.4, 132.9, 133.0, 142.5. MS (EI, 70 eV): *m/z* (%): 282 (14), 281 (M⁺, 72), 178 (14), 136 (23), 90 (18). Anal. Calcd for C₁₆H₁₁NO₄: C, 68.32; H, 3.94. Found: C, 68.33; H, 3.96.
6-Methyl-3-(3'-nitrophenyl)coumarin (2): Yield: 74%. Mp: 96–97 °C. ¹H NMR (300 MHz; DMSO-*d*₆): δ = 2.37 (s, 3H, CH₃), 7.21 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H-7, H-8), 7.50–7.56 (m, 2H, H-5, H-5'), 7.87 (d, J = 6.5 Hz, 1H, H-6'), 8.17 (s, 1H, H-4), 8.28–8.37 (m, 2H, H-2', H-4'). ¹³C NMR (75 MHz; DMSO-*d*₆): δ = 20.6, 122.6, 123.9, 125.1, 127.9, 130.2, 131.4, 136.4, 136.6, 136.8, 137.2, 148.1, 149.3, 170.2, 190.6. DEPT (75 MHz; DMSO-*d*₆): δ = 20.6, 122.6, 123.9, 125.1, 130.2, 131.4, 136.6, 137.2, 190.6. MS (EI, 70 eV): *m/z* (%): 282 (8), 281 (M⁺, 43), 253 (7), 235 (8), 178 (15), 163 (10), 136 (38), 90 (15). Anal. Elem. Calcd for C₁₆H₁₁NO₄: C, 68.32; H, 3.94. Found: C, 68.38; H, 3.99.
6-Methyl-3-(4'-nitrophenyl)coumarin (3): Yield: 80%. Mp: 100–101 °C.
General procedure for the synthesis of 3-aminophenyl-6-methylcoumarins 4–6: The previously prepared 6-methyl-3-nitrophenylcoumarin (**1**, **2** or **3**, 2.46 mmol) was dissolved in ethanol (5 mL) and a catalytic amount of Pd/C was added to the mixture. The solution was stirred, at room temperature, under a H₂ atmosphere, for 3 h. After completion of the reaction, the mixture was filtered to eliminate the catalyst. The obtained crude was then purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 9:1) to give the desired coumarin **4–6** as white solids in yields between 92% and 97%.
3-(2'-Aminophenyl)-6-methyl-coumarin (4): Yield: 92%. Mp: 139–140 °C.
3-(3'-Aminophenyl)-6-methyl-coumarin (5): Yield: 95%. Mp: 156–157 °C. ¹H NMR (300 MHz; CDCl₃): δ = 2.48 (s, 3H, CH₃), 3.98 (s, 2H, NH₂), 7.32–7.35 (m, 1H, H-4'), 7.32–7.40 (m, 2H, H-5', H-6'), 7.55–7.58 (m, 1H, H-7), 7.69–7.72 (m, 1H, H-8), 7.82 (s, 1H, H-2'), 7.87–7.91 (m, 1H, H-5), 7.92 (s, 1H, H-4). ¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃): δ = 24.9, 116.3, 125.4, 127.2, 127.8, 129.9, 130.0, 130.1, 131.4, 131.7, 132.9, 134.2, 134.4, 140.5, 151.8, 191.9. DEPT (75 MHz; CDCl₃): δ = 24.9, 116.3, 127.2, 127.8, 129.9, 131.4, 131.7, 132.9, 140.5. MS (EI, 70 eV): *m/z* (%): 252 (18), 251 (M⁺, 90), 236 (90), 178 (18), 154 (19), 147 (21), 134 (58), 129 (25), 125 (18), 116 (20), 112 (37), 111 (29), 109 (17). Anal. Calcd for C₁₆H₁₃NO₂: C, 76.48; H, 5.21. Found: C, 76.39; H, 5.15.
3-(4'-Aminophenyl)-6-methyl-coumarin (6): Yield: 97%. Mp: 191–192 °C.
43. Pharmacological assays—General methods: The tested compounds were dissolved in DMSO (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Madrid, Spain) to prepare 10 mM stock solutions which were kept for storage at –20 °C. Percentage of DMSO used in the experiments was never higher than 1%. Selegiline, used as reference inhibitor, have been acquired from Sigma-Aldrich (Alcobendas, Madrid, Spain). Moclobemide has been kindly provided by Hoffman-La Roche Laboratories (Basel, Switzerland). Human recombinant MAO isoforms, used in the experiments, was purchased from Sigma-Aldrich (Alcobendas, Madrid, Spain). Resorufin sodium salt, *p*-tyramine hydrochloride, sodium phosphate buffer, horseradish peroxidase and Amplex[®] Red reagent has been supplied in the assay kit of Amplex[®] Red MAO Molecular Probes (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, USA).
Determination of MAO isoforms enzymatic activity: Briefly, 0.1 mL of sodium phosphate buffer (0.05 M, pH 7.4) containing different concentrations of the test drugs (new compounds or reference inhibitors) in various concentrations and adequate amounts of recombinant hMAO-A or hMAO-B required and adjusted to obtain in our experimental conditions the same reaction velocity, that is, to oxidize (in the control group) the same concentration of substrate: 165 pmol of *p*-tyramine/min (hMAO-A: 1.1 µg protein; specific activity: 150 nmol of *p*-tyramine oxidized to *p*-hydroxyphenylacetaldehyde/min/mg protein; hMAO-B: 7.5 µg protein; specific activity: 22 nmol of *p*-tyramine transformed/min/mg protein) were incubated for 15 min at 37 °C in a flat-black-bottom 96-well microtest plate, placed in the dark fluorimeter chamber. After this incubation period, the reaction was started by adding (final concentrations) 200 µM Amplex[®] Red reagent, 1 U/mL horseradish peroxidase and 1 mM *p*-tyramine. The production of H₂O₂ and, consequently, of resorufin was quantified at 37 °C in a multidetection microplate fluorescence reader (FLX800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) based on the fluorescence generated (excitation, 545 nm, emission, 590 nm) over a 15 min period, in which the fluorescence increased linearly.⁴³ Control experiments were carried out simultaneously by replacing the test drugs (new compounds and reference inhibitors) with appropriate dilutions of the vehicles. In addition, the possible capacity of the above test drugs to modify the fluorescence generated in the reaction mixture due to non-enzymatic inhibition (e.g., for directly reacting with Amplex[®] Red reagent) was determined by adding these drugs to solutions containing only the Amplex[®] Red reagent in a sodium phosphate buffer. To determine the kinetic parameters of hMAO-A and hMAO-B (*K_m* and *V_{max}*), the corresponding enzymatic activity of both isoforms was evaluated (under the experimental conditions described above) in the presence of a number (a wide range) of *p*-tyramine concentrations. The specific fluorescence emission (used to obtain the final results) was calculated after subtraction of the background activity, which was determined from wells containing all components except the hMAO isoforms, which were replaced by a sodium phosphate buffer solution. In our experimental conditions, this background activity was practically negligible. MAO activity of the test compounds and reference inhibitors is expressed as IC₅₀, i.e. the concentration of each drug required to produce a 50% decreased on control value activity isoforms MAO.
44. Yáñez, M.; Fraiz, N.; Cano, E.; Orallo, F. Biochem. Biophys. Res. Commun. **2006**, *344*, 688.
45. Rodríguez-Franco, M. I.; Fernández-Bachiller, M. I.; Pérez, C.; Hernández-Ledesma, B.; Bartolomé, B. J. Med. Chem. **2006**, *49*, 459.
46. Fernández-Bachiller, M. I.; Pérez, C.; Monjas, L.; Rademann, J.; Rodríguez-Franco, M. I. J. Med. Chem. **2012**, *55*, 1303.
47. López-Iglesias, B.; Pérez, C.; Morales-García, J. A.; Alonso-Gil, S.; Pérez-Castillo, A.; Romero, A.; López, M. G.; Villarroja, M.; Conde, S.; Rodríguez-Franco, M. I. J. Med. Chem. **2014**, *57*, 3773.
48. In vitro blood-brain barrier permeation assay: Prediction of the brain penetration was evaluated using a PAMPA-BBB assay, in a similar manner as previously described.^{27,45–47} Pipetting was performed with a semi-automatic robot (CyBi[®]-SELMA) and UV reading with a microplate spectrophotometer (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Co.). Commercial drugs, phosphate buffered saline solution at pH 7.4 (PBS), and dodecane were purchased from Sigma, Aldrich, Acros, and Fluka. Millex filter units (PVDF membrane, diameter 25 mm, pore size 0.45 µm) were acquired from Millipore. The porcine brain lipid (PBL) was obtained from Avanti Polar Lipids. The donor microplate was a 96-well filter plate (PVDF membrane, pore size 0.45 µm) and the acceptor

microplate was an indented 96-well plate, both from Millipore. The acceptor 96 well microplate was filled with 200 μL of PBS/ethanol (70:30) and the filter surface of the donor microplate was impregnated with 4 mL of PBL in dodecane (20 mg mL⁻¹). Compounds were dissolved in PBS/ethanol (70:30) at 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, filtered through a Millex filter, and then added to the donor wells (200 μL). The donor filter plate was carefully put on the acceptor plate to form a sandwich, which was left undisturbed for 240 min at 25 °C. After incubation, the donor plate is carefully removed and the concentration of compounds in the acceptor wells was determined by UV-vis spectroscopy. Every sample is analyzed at five wavelengths, in four wells and at least in three independent runs, and the results are given as the mean \pm standard deviation. In each experiment, 10 quality control standards of known BBB permeability were included to validate the analysis set.

49. *Theoretical evaluation of absorption, distribution, metabolism and excretion properties*: The absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) properties of the studied compounds were calculated using the Molinspiration property programme. Log *P* was calculated using the methodology developed by Molinspiration as a sum of fragment-based contributions and correction factors (48). Topological polar surface area (TPSA) was calculated based on the methodology published by Ertl et al. as a sum of fragment contributions. Oxygen and nitrogen-centred polar fragments were considered (48). Polar surface area (PSA) has been shown to be a very good descriptor characterizing drug absorption, including intestinal absorption, bioavailability, Caco-2 permeability and blood-brain barrier penetration. The method for calculation of molecule volume developed at Molinspiration is based on group contributions. These have been obtained by fitting the sum of fragment contributions to 'real' three-dimensional (3D) volume for a training set of about 12,000, mostly drug-like molecules. 3D molecular geometries for a training set were fully optimized by the semi-empirical AM1 method.
50. M cheminformatics, Bratislava, Slovak Republic, <http://www.molinspiration.com/services/properties.html>.
51. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3.
52. Copeland, R. A. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*; Wiley-Interscience: Hoboken, 2005.
53. *Determination of inhibition mode*: To evaluate whether compounds **8**, **14**, and **15** are reversible or irreversible hMAO-B inhibitors, a dilution method was used.⁵² A 100 \times concentration of the enzyme used in the above described experiments was incubated with a concentration of inhibitor equivalent to 10-fold its IC₅₀ value. After 30 min, the mixture was diluted 100-fold into reaction buffer containing Amplex Red reagent, horseradish peroxidase, and p-tyramine, and

the reaction was monitored for 15 min. Reversible inhibitors show linear progress with a slope equal to $\sim 91\%$ of the slope of the control sample, whereas irreversible inhibition reaches only $\sim 9\%$ of this slope. Control tests were carried out by pre-incubating and diluting the enzyme in the absence of inhibitor.

54. Gerlach, M.; Riederer, P.; Youdim, M. B. *Eur. J. Pharmacol.* **1992**, *226*, 97.
55. *Molecular docking calculations*: We performed molecular docking simulations using the Schrödinger package.⁵⁶
Ligand preparation: Our dataset is made out of the coumarin derivatives **1–6** and the co-crystallized coumarins in 2V60 and 2V61 (PDB code)⁵⁷ used to validate the docking protocol. We used LigPrep module⁵⁶ to generate possible protonation states at pH 7.0 \pm 2.0, possible tautomers, and optimized structures for all the ligands.
Protein preparation: We used the crystal structure of the hMAO-B (PDB:2V60) to run the docking simulations. In 2V60 the protein is bound to the coumarin derivative **c17**. We preprocessed the protein structure with the Protein Preparation Wizard.⁵⁶ In this step we assigned bond orders, added hydrogens, created disulfide bonds, filled possible missing side chains, added cap termini, deleted water molecules except the water that establishes a hydrogen bond with the co-crystallized coumarin derivative **c17** and optimized the H-bond network, including reorientation of hydroxyl groups and optimization of the protonation state of some residues.
Receptor grid: As a previous step to docking, we generated a receptor grid centered in the coumarin derivative **c17** with a length of 20 Å. The *van der Waals* scaling factor was 1.0 with 0.25 as a partial charge cut-off.
Molecular docking procedure: We performed molecular docking simulations in the hMAO-B using Glide Standard Precision level.⁵⁶ For each ligand, five poses were retained. The final pose selection was made based on the energy score E_{model} . Protein pocket and ligand poses were optimized using Prime MM-GBSA.⁵⁶
56. Schrödinger Package, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014. <https://www.schrodinger.com>.
57. Binda, C.; Wang, J.; Pisani, L.; Caccia, C.; Carotti, A.; Salvati, P.; Edmondson, D. E.; Mattevi, A. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5848.
58. Matos, M. J.; Janeiro, P.; González-Franco, R. M.; Vilar, S.; Tatonetti, N. P.; Santana, L.; Uriarte, E.; Borges, F.; Fontenla, J. A.; Viña, D. *Fut. Med. Chem.* **2014**, *6*, 371.
59. Matos, M. J.; Vilar, S.; García-Morales, V.; Tatonetti, N. P.; Uriarte, E.; Santana, L.; Viña, D. *Chem. Med. Chem.* **2014**, *9*, 1488.
60. Ferino, G.; Vilar, S.; Matos, M. J.; Uriarte, E.; Cadoni, E. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12*, 2145.

